

Aus dem Institut für Virologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Stephan Becker
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Molekulare Infektionsmechanismen des Lassavirus im humanen respiratorischen Epithel und die Entwicklung eines Antikörper-basierten Therapieansatzes

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Helena Müller-Kräuter, geb. Müller

Aus Dshansugurowa, Kasachstan

Marburg, 2021

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: **06.04.2021.**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

Dekanin: Frau Prof. Dr. D. Hilfiker-Kleiner

Referent: Herr Dr. T. Strecker

Korreferent: Herr Prof. Dr. B. Schmeck

*Für meine Familie,
die Große und die Kleine*

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	1
2.	Einleitung	4
2.1	Das Lassavirus	4
2.1.1	Morphologie und Genomaufbau des Lassavirus.....	4
2.1.2	Lassavirale Proteine	5
2.1.3	Der LASV-Replikationszyklus	7
2.1.4	Epidemiologie und Pathogenese des LASV	8
2.1.5	Antivirale Therapie	9
2.2	Das humane respiratorische Epithel.....	10
2.2.1	Mukoziliärer Transport im Respirationstrakt.....	11
2.2.2	Polare Epithelzellen als mechanische Barriere	12
2.2.3	Antivirale Immunantwort im respiratorischen Epithel	12
2.3	Ziel der Arbeit	15
3.	Materialien.....	16
3.1	Chemikalien.....	16
3.2	Verbrauchsmaterialien	17
3.3	Kommerziell erhältliche Reaktionsansätze	18
3.4	Geräte	18
3.5	Puffer	19
3.6	Größenstandard.....	20
3.7	DNA-Oligonukleotide (Primer).....	20
3.7.1	Virus-spezifische Primer	20
3.7.2	Zell-spezifische Primer	20
3.8	Vektoren und rekombinante Plasmide	21

3.8.1	Vektoren.....	21
3.8.2	Rekombinante Plasmide.....	21
3.9	Enzyme.....	22
3.10	Antikörper.....	22
3.10.1	Primärantikörper.....	22
3.10.2	Sekundärantikörper.....	23
3.11	Zellkultur.....	23
3.11.1	Zelllinien.....	23
3.11.2	Zellkulturmedien.....	24
3.12	Viren.....	24
4	Methoden.....	25
4.1	Molekularbiologische Methoden.....	25
4.1.1	RNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen.....	25
4.1.2	Synthese der komplementären DNA (cDNA).....	25
4.1.3	Quantitative <i>Real Time</i> PCR (qPCR).....	26
4.1.4	Einstufige Quantitative <i>Real Time</i> PCR.....	26
4.2	Proteinbiochemische und immunologische Methoden.....	27
4.2.1	Lyse von eukaryotischen Zellen.....	27
4.2.2	Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)..	27
4.2.3	Proteingelfärbung.....	28
4.2.4	Elektrotransfer der Proteine auf Nitrozellulosemembran (Western Blot).....	28
4.2.5	Immunologischer Nachweis von Proteinen auf einer Nitrozellulose-Membran.....	28
4.2.6	Indirekte Immunfluoreszenz-Analysen von unpolaren Zellen.....	29
4.2.7	Indirekte Immunfluoreszenz-Analysen von polaren Zellen.....	29
4.2.8	Quantifizierung von IgG-Antikörpern.....	30

4.2.9	Aufreinigung von IgG-Antikörpern aus Kaninchenserum.....	32
4.2.10	Verdau mit Endoglykosidasen	32
4.3	Zellkulturtechniken mit eukaryotischen Zelllinien.....	32
4.3.1	Langzeitlagerung und Auftauen von eukaryotischen Zelllinien	32
4.3.2	Passagieren und Aussäen von eukaryotischen Zelllinien	33
4.3.3	Transfektion eukaryotischer Zellen mit TransIT-LT 1 Reagenz	33
4.3.4	Herstellung von LASV GP-induzierten Virus-ähnlichen Partikeln (VLPs).....	34
4.4	Arbeitsmethoden mit humanen primären bronchialen Epithelzellen.....	34
4.4.1	Auftauen und Inkulturnahme.....	34
4.4.2	Passagieren und Aussäen	35
4.4.3	Kollagenbeschichtung von Transwell-Filtern	35
4.4.4	Kultivierung auf Transwell-Filtern	36
4.4.5	Bestimmung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER)	37
4.4.6	Gewinnung und Anreicherung von Muzinen	37
4.4.7	Histologische Aufbereitung	38
4.5	Virologische Methoden.....	38
4.5.1	Herstellung einer LASV-Stammsuspension	38
4.5.2	Herstellung einer VSV- und VSVΔG/LASVGP-Stammsuspension	39
4.5.3	Anreicherung von LASV-Partikeln	39
4.5.4	Infektionsstudien in unpolaren Zellen	39
4.5.5	Infektionsstudien in differenzierten HBEpCs	42
4.5.6	Virustiterbestimmung	43
5	Ergebnisse	45
5.1	LASV-Infektion in humanen Atemwegsepithelzellen.....	45
5.1.1	Generierung von polaren HBEpC auf Transwell-Filtern	46
5.1.2	Charakterisierung des mehrreihigen Epithels aus HBEpCs	47

5.1.3	Bipolarer Viruseintritt und gerichtete LASV-Freisetzung aus polaren Epithelzellen	49
5.1.4	LASV-Ausbreitung in die Submukosa des respiratorischen Epithels.....	51
5.1.5	LASV-Wirtszelltropismus in humanen bronchialen Epithelzellen	53
5.1.6	Atemwegsmuzine haben keinen hemmenden Effekt auf eine LASV GP-vermittelte Infektion	55
5.1.7	IFN-Induktion in humanen bronchialen Epithelzellen nach einer LASV-Infektion.....	57
5.1.8	IFN- λ -Vorstimulation reduziert die LASV-Replikation in HBEPs.....	59
5.2	VLP-induzierte LASV GP-spezifische Antikörper als potentieller Therapieansatz	61
5.2.1	Herstellung von LASV GP VLPs für die Immunisierung von Kaninchen.....	61
5.2.2	Induktion von LASV GP-spezifischen Antikörpern in hyperimmunisierten Kaninchen..	63
5.2.3	Quantifizierung und Charakterisierung von LASV GP-spezifischen Antikörpern	65
5.2.4	Kreuzreaktivität bei LASV GP VLP-induzierten Antikörpern.....	67
5.2.5	LASV GP VLP-induzierte Bildung von neutralisierenden Antikörpern.....	68
5.2.6	Induktion von kreuzneutralisierenden LASV GP-spezifischen Antikörpern	68
5.2.7	Vergleich der neutralisierenden Aktivität von LASV GP VLP-induzierten Antikörpern..	69
5.2.8	Mehrmalige VLP-Immunisierung ist für eine robuste Antikörperantwort erforderlich.	71
5.2.9	Neutralisationsmechanismus der LASV GP VLP-induzierten Antikörper	73
5.2.10	Aufgereinigte IgG Antikörper zeigen eine erhöhte neutralisierende Aktivität	74
5.2.11	VLP-induzierte Antikörper hemmen eine LASV-Infektion von humanen Zielzellen	75
6	Diskussion.....	78
6.1	LASV-Infektion der humanen Atemwege	78
6.1.1	Bipolarer Viruseintritt und gerichtete Virusfreisetzung des LASV	78
6.1.2	LASV-Zelltropismus im bronchialen Epithel	81
6.1.3	IFN- λ -Induktion in HBEPs	82
6.2	LASV GP VLPs induzieren neutralisierende Antikörper in hyperimmunisierten Tieren	84
6.2.1	LASV GP VLPs sind immunogen und induzieren neutralisierende Antikörper.....	84

6.2.2	LASV GP VLP-induzierte Antikörper sind kreuzreaktiv	85
6.2.3	Neutralisationsmechanismus der GP VLP-induzierten Antikörper	86
6.2.4	LASV GP VLP-induzierte Antikörper als potenzielle Therapie	87
	Literaturverzeichnis	90
	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	104
	Abkürzungsverzeichnis	105
	Veröffentlichungen.....	109
	Verzeichnis der akademischen Lehrer/-innen.....	110
	Danksagung	111

1. Zusammenfassung

Das Lassavirus (LASV) gehört zur Familie der Arenaviren und kommt in einigen Ländern Westafrikas endemisch vor. Jährlich infizieren sich zwischen 100.000 und 300.000 Menschen, von denen ca. 5.000 an den Folgen der Infektion versterben. Die Symptome variieren von einem milden grippeähnlichen Verlauf, bis hin zu einem schweren viralen hämorrhagischen Fieber, dem Lassafieber. Bis heute steht keine wirksame Therapie oder ein Impfstoff zur Verfügung. Chronisch infizierte Nagetiere der Spezies *Mastomys natalensis* stellen das natürliche Hauptreservoir dar und scheiden das Virus mit dem Urin und Kot aus. Zur Übertragung auf den Menschen kommt es u.a. durch die Inhalation von erregerrhaltigem Staub und Aerosolen. Unklar ist bisher, wie das LASV die Barriere aus respiratorischen Epithelzellen überwindet, um im Anschluss systemisch zu streuen und weitere Zielorgane zu infizieren. Für die Untersuchung einer LASV-Infektion des humanen Respirationstrakts wurde in der vorliegenden Arbeit ein primäres Zellkultursystem aus differenzierten humanen bronchialen Epithelzellen (HBEpCs) verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass das LASV das respiratorische Epithel sowohl über die apikale als auch die basolaterale Membranseite infizieren kann. Studien zum Wirtszelltropismus des LASV legen bei der initialen Infektion unterschiedliche Zelltypen in Abhängigkeit der Infektionsroute nahe. Die gerichtete Virusfreisetzung erfolgt überwiegend über die apikale Membran, was durch Untersuchungen zur zellulären Lokalisation von LASV GP bestätigt wurde. Die Virusfreisetzung über die basolaterale Membran in die Submukosa erfolgt hingegen erst, nachdem die LASV-Infektion zu einem Verlust der Epithelintegrität geführt hat. Eine LASV-Infektion der humanen Atemwege führt ebenso wie die Infektion von Immunzellen nicht zur Induktion von Typ I Interferon (IFN), wohingegen die Induktion von Typ III IFN bereits früh einsetzt. Darüber hinaus scheint die Infektionsroute einen Einfluss auf die Typ III IFN-Antwort zu haben.

Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob LASV GP VLP-induzierte Antikörper aus Kaninchenserum eine LASV-Infektion hemmen können. Es konnte gezeigt werden, dass die GP VLP-Immunisierung die Bildung von GP1- und GP2-spezifischen Antikörpern induziert. Mit Hilfe der affinitätsgereinigten LASV GP-spezifischen Antikörper konnte die Infektion in relevanten humanen Zielzellen gehemmt werden. Zusätzlich weisen die polyklonalen Antiseren eine hohe kreuzneutralisierende Aktivität gegen fünf phylogenetisch unterschiedliche LASV-Linien auf.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten nicht nur neue Erkenntnisse liefern, die zu einem besseren Verständnis der molekularen Pathogenitätsmechanismen des LASV beitragen, sondern auch zur Entwicklung von potenziellen Therapieansätzen genutzt werden können.

Summary

Lassa virus (LASV) belongs to the family *Arenaviridae* and is endemic to several West African countries. An estimated 100,000–300,000 infections occur annually with approximately 5,000 deaths. While most of the infections are mild or asymptomatic, approximately 20% progress to more severe health conditions, including hemorrhagic fever. To date, no specific antiviral drug or approved vaccine is available. Chronically infected rodents of the species *Mastomys natalensis* are the main rodent reservoir. Transmission of LASV from its rodent host to humans is thought to occur mainly via inhalation of dust or droplets contaminated with infectious rodent excretions. Although the respiratory tract is an important entry site for LASV, the mechanism of overcoming the epithelial barrier is unknown.

To examine LASV infection processes of the human respiratory tract, the present work aimed to establish an air-liquid interface (ALI) cell culture model using differentiated human bronchial epithelial cells (HBEpCs). This *in vitro* cell system closely resembling composition, structure, and functional properties of the human airway epithelium *in vivo* was then used to analyse LASV replication kinetics, the polarity of viral entry and release, and to determine cell tropism of LASV in the bronchial epithelium.

LASV can infect the respiratory epithelium via both the apical and basolateral membrane, though different cell types are targeted during initial infection depending on the route of infection. Directed virus release occurred predominantly via the apical membrane, which is in agreement with an intrinsic apical localization of LASV GP. Virus release into the submucosal tissue via the basolateral membrane site was observed upon disruption of the epithelial integrity and thus polarity during multicyclic LASV replication. Similar to what has been observed in infected immune cells, LASV infection of the human respiratory tract does not induce a robust type I IFN response. However, infection of HBEpCs induced a strong type III IFN response. Interestingly, the type III IFN response was more pronounced upon LASV addition to the basolateral cell surface, suggesting that the antiviral immune response depends on the site of virus entry.

In addition, the present study aimed to analyze the immunogenic potential of native-like trimeric GP expressed on the surface of LASV GP VLPs. Immunization of rabbits with these VLPs induced broadly neutralizing GP-specific antibodies capable of inhibiting the infection of relevant LASV human target cells, including airway epithelial cells. Functional characterization revealed that these neutralizing antibodies blocked virus-host interactions at the pre- and-post attachment level during viral entry. Furthermore, the polyclonal antisera show cross-neutralising activity against five phylogenetically different LASV lineages.

In summary, the data obtained in the present work do not only provide new insights that contribute to a better understanding of the molecular pathogenicity mechanisms of LASV, but also to the development of novel potential therapeutic approaches against highly pathogenic LASV.

2. Einleitung

2.1 Das Lassavirus

Das Lassavirus (LASV) gehört zur Familie der *Arenaviridae*, die sich phylogenetisch in vier Gattungen unterteilen lässt. Viren des Genus *Antennavirus* konnten aus Strahlenflossern (*Actinopterygii*) isoliert werden (Shi et al., 2018), während Vertreter der Genera *Hartmanivirus* und *Reptarenavirus* in Reptilien nachgewiesen wurden (Hepojoki et al., 2018; Stenglein et al., 2012). Das Genus *Mammarenavirus* umfasst derzeit 39 Spezies mit 46 Viren, die aufgrund ihrer genetischen Unterschiede, geografischen Verteilung und epidemiologischen Verwandtschaft in die Hauptgruppen der Altwelt- und Neuweltarenaviren unterteilt werden (Charrel et al., 2008; Wolff et al., 1978).

Das LASV gehört zur Gruppe der Altweltarenaviren. Die verschiedenen Vertreter der LASV-Spezies werden in vier bekannte (I-IV) sowie drei erst kürzlich beschriebene neue taxonomische Linien eingeteilt, die in bestimmten geografischen Regionen Westafrikas vorkommen (Andersen et al., 2015). Linie I wurde im Nordosten Nigerias isoliert, während Linie II hauptsächlich in Südnigeria verteilt ist und Linie III in Nord-Zentral-Nigeria zirkuliert (Ehichioya et al., 2019). Vertreter der Linie IV sind in Sierra Leone, Guinea und Liberia endemisch (Andersen et al., 2015). Die zusätzlichen Linien umfassen: Linie V aus Mali und der Elfenbeinküste, eine mögliche Linie VI aus Nigeria und die potenzielle Linie VII aus Togo (Manning et al., 2015; Olayemi et al., 2016; Whitmer et al., 2018).

2.1.1 Morphologie und Genomaufbau des Lassavirus

Das LASV ist ein sphärisches und lipidumhülltes Virus mit einem Durchmesser von 50-300 nm (Abb. 2.1a). Die Innenseite der Virushülle ist vom Matrixprotein Z ausgekleidet (Strecker et al., 2003). Durch die Aufnahme von Ribosomen der Wirtszelle in das Virion sind interne Granula in elektronenmikroskopischen Aufnahmen sichtbar (Dalton et al., 1968). Auf der viralen Oberfläche befindet sich das vollständig prozessierte Glykoprotein (GP), das aus dem stabilen Signalpeptid (SSP; engl. *stable signal peptide*) und den Untereinheiten GP1 und GP2 besteht, die die Bindung an die Wirtszellrezeptoren bzw. die Fusion der Virushülle mit der endosomalen Membran vermitteln (Cao et al., 1998; Jae et al., 2014; Klewitz et al., 2007a). Das virale Genom ist mit dem Nukleoprotein NP und der viralen Polymerase L komplexiert und wird als Ribonukleoprotein (RNP)-Komplex bezeichnet. Das LASV besitzt ein bi-segmentiertes, einzelsträngiges RNA-Genom, das für vier virale Gene in einer *Ambisense*-Strategie kodiert (Auperin et al., 1986). Dies bedeutet, dass die beiden Genomsegmente sowohl in negativer als auch in positiver Leserichtung für jeweils zwei Gene kodieren (Abb. 2.1b). Die Leserahmen beider Gene sind durch eine intergenische Region, die als Terminationssignal für die Transkription dient, voneinander getrennt (Auperin et al., 1984; Pinschewer et al., 2005). Das kleine RNA-Segment (S-Segment, 3,4 kb) kodiert in negativer Orientierung für das Nukleoprotein (NP) und in positiver Orientierung für den Glykoprotein-Vorläufer (PräGPC) (Auperin et al., 1986; Clegg und Oram, 1985). Das große RNA-Segment (L-Segment, 7,2 kb) kodiert in negativer Orientierung für die

RNA-abhängige RNA-Polymerase L und in entgegengesetzter Orientierung für das kleine RING-Fingerprotein Z (Djavani et al., 1997; Lukashevich et al., 1997). An den 3'- und 5'-Enden der beiden RNA-Segmente befinden sich konservierte Nukleotide, die invertiert komplementär zueinander sind und so die Ausbildung von doppelsträngigen Bereichen vermitteln und den Segmenten eine quasizirkuläre Konformation verleihen (Young und Howard, 1983).

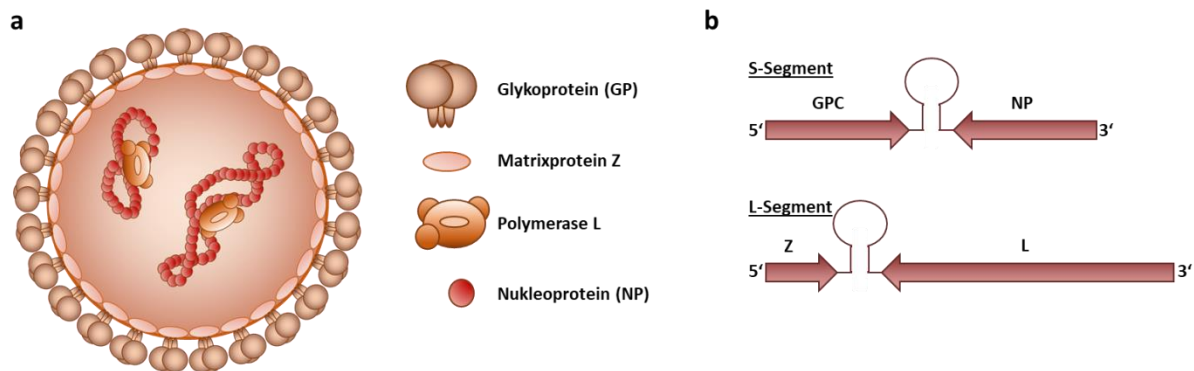


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Arenavirus (a) und seiner Genomorganisation (b). (a) Der Glykoproteinkomplex ist in die Virushülle inseriert und vermittelt die Rezeptorbindung und den Viruseintritt in die Wirtszelle. Das Nukleoprotein NP umgibt die RNA-Segmente S und L und ist mit der viralen Polymerase L komplexiert. Das Matrixprotein Z kleidet die Virushülle von innen aus. (b) Die RNA-Segmente S und L kodieren in *Ambisense*-Orientierung für je zwei Proteine.

2.1.2 Lassavirale Proteine

2.1.2.1 Nukleoprotein NP, Polymerase L und Matrixprotein Z

NP hat ein Molekulargewicht von etwa 63 kD und ist ein Bestandteil der RNP-Komplexe innerhalb des Viruspartikels, wo es die viralen RNA-Segmente enkapsidiert (Hastie et al., 2011b). NP besitzt eine Exonuklease-Aktivität, die spezifisch für doppelsträngige RNA-Substrate ist (Hastie et al., 2011a). Durch diese Funktion besitzt NP die Fähigkeit, die Translokation von IRF (*interferon-regulating factor*) 3 zu unterdrücken und so die Interferon (IFN) Antwort zu antagonisieren (Hastie et al., 2011a; Martínez-Sobrido et al., 2007). Zusätzlich wird NP vom Matrixprotein Z an die zelluläre Membran rekrutiert, wo es zur Virusfreisetzung kommt (Eichler et al., 2004).

Das L-Protein hat ein Molekulargewicht von 250 kD und bildet mit der viralen RNA und dem NP die RNP-Komplexe. Es besteht aus einer zentralen enzymatisch-aktiven Domäne, der RNA-abhängigen RNA-Polymerase und akzessorischen Untereinheiten, die u.a. für die Bindung der 5'-Cap-Struktur verantwortlich sind (Rosenthal et al., 2017). In Wechselwirkung mit dem NP vermittelt es die virale RNA-Synthese und die virale mRNA-Transkription (Brunotte et al., 2011; Kranzusch et al., 2010).

Das Matrixprotein Z hat ein Molekulargewicht von ca. 11 kD und ist somit das kleinste lassavirale Strukturprotein (Salvato und Shimomaye, 1989). Es enthält drei Domänen, die zu seiner multifunktionellen Natur beitragen. Die N-terminale Domäne enthält eine Myristylierungsstelle, über die die Bindung an intrazelluläre Membranen sowie an die Plasmamembran vermittelt wird (Perez et

al., 2004; Strecker et al., 2006). Die zentrale Domäne enthält eine RING (*Really Interesting New Gene*)-Struktur, die Zink-Ionen bindet und für die Wechselwirkung mit NP und dem L-Protein essentiell ist (Capul et al., 2011; Loureiro et al., 2011; Wilda et al., 2008). Durch die Interaktion des Z-Proteins mit NP und GP werden der Zusammenbau und die Freisetzung der neu synthetisierten Virionen vermittelt (Perez et al., 2003). Die C-terminale Domäne von Z enthält prolinreiche Motive, die mit der zellulären ESCRT (*endosomal sorting complexes required for transport*)-Maschinerie interagieren (Perez et al., 2003). Zusätzlich initiiert das Z-Protein bereits bei rekombinanter Einzelexpression die Freisetzung von Virus-ähnlichen Partikeln (VLPs; engl. *virus-like particles*) (Ziegler et al., 2016). Darüber hinaus reguliert das Z-Protein die virale mRNA-Transkription und antagonisiert über die Interaktion mit RIG-I (*retinoic acid-inducible gene 1*) die zelluläre IFN-Antwort (Fan et al., 2010; López et al., 2001).

2.1.2.2 Glykoprotein GP

Das Glykoprotein GP wird als inaktiver Vorläufer PräGPC synthetisiert und hat eine Molekulargewichtsgröße von 76 kD (Auperin et al., 1986). Nach der Expression wird das PräGPC zunächst ko-translational von einer zellulären Signalpeptidase in GPC und SSP gespalten (Eichler et al., 2003b). Anschließend wird es post-translational durch die Wirtszell-Proteinkonvertase S1P (*site 1 protease*), auch bekannt als SKI-1 (*subtilisin kexin isozyme-1*), in die beiden Glykoproteinuntereinheiten GP1 und GP2 gespalten. Diese proteolytische Prozessierung ist essentiell für die GP-Funktion und die Virusinfektiosität (Lenz et al., 2001). GP1 vermittelt die Rezeptorbindung und ist nicht kovalent an GP2 gebunden, welches über die Transmembrandomäne in die Lipidhülle inseriert ist. Das SSP bleibt mit dem Glykoproteinkomplex assoziiert und wird als Komponente des dreiteiligen Glykoprotein-Spike-Komplex in die neugebildeten Virionen eingebaut, was ein einzigartiges strukturelles Merkmal des GP von LASV und anderen Arenaviren dargestellt (Eichler et al., 2003a; Schlie et al., 2010c). Das SSP spielt eine wichtige Rolle bei der Reifung und dem Zusammenbau des GP sowie beim Membranfusionsprozess während des Viruseintritts (zusammengefasst in (Nunberg und York, 2012)). Zusätzlich zu SSP ist die zytoplasmatische Domäne am C-Terminalen Ende des GP2 eine kritische Komponente für die Stabilität und Konformation der externen GP-Domänen (Schlie et al., 2010c). Das vollständig assemblierte GP liegt auf der viralen Oberfläche als Trimer, bestehend aus drei GP1/GP2-Heterodimeren, vor (Cao et al., 1998; Jae et al., 2014; Klewitz et al., 2007b; York et al., 2005). Die GP-Spike-Komplexe sind weitgehend glykosyliert, wobei die N-gebundenen Glykane von der Wirtszelle stammen und ca. 30% der Molekülmasse ausmachen (Eichler et al., 2006). Die N-gebundenen Glykane sind essentiell für die korrekte Faltung, Spaltung und den Transport des GP, sowie für die Infektiosität der neu gebildeten Virionen (Bonhomme et al., 2011; Eichler et al., 2006; Wright et al., 1990).

Das GP ist ein Ziel von Antikörpern und einer T-Zell-vermittelten Immunantwort und gilt daher als primäres Immunogen für die Entwicklung von LASV-Impfstoffen (Meulen et al., 2004; Robinson et al., 2016; Sommerstein et al., 2015). Dabei ist GP1 die variabelste Untereinheit, während die

GP2-Untereinheit innerhalb der Mammarenaviren hochkonserviert ist (Amanat et al., 2018; Bowen et al., 2000). GP2 vermittelt den Eintritt, die Fusion und die Transmembranverankerung und ist vermutlich daher weniger tolerant gegenüber Veränderungen (Meulen et al., 2004). Unter den vier bestätigten Linien I-IV liegt die Aminosäurevariation des GP zwischen 4,9-11,0% (Hallam et al., 2018a), was die Entwicklung eines Pan-LASV-Impfstoffes und PCR-basierten Diagnostikmethoden erschwert.

2.1.3 Der LASV-Replikationszyklus

Der Eintritt des LASV in die Wirtszelle erfolgt über die Bindung von GP1 an spezifische zelluläre Rezeptoren. Das LASV weist einen breiten Wirtszelltropismus auf und nutzt für den Viruseintritt mehrere zelluläre Rezeptoren, wobei die α -Untereinheit des Dystroglykans (α -DG) den Hauptrezeptor darstellt (Cao et al., 1998). α -DG bindet Komponenten der extrazellulären Matrix und wird in zahlreichen Geweben exprimiert (Barresi und Campbell, 2006; Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1992). Die weiteren Rezeptoren sind die Mitglieder der TAM-Familie Axl und Tyro3, sowie DC-SIGN (*dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grapping nonintegrin*) und LSECtin (*liver and lymphnode sinusoidal endothelial calcium-dependent lectin*) (Shimojima et al., 2012). Nach der Rezeptorbindung kommt es durch eine Rezeptor-vermittelte Endozytose und der anschließenden Fusion der Virushülle mit der endosomalen Membran zum Viruseintritt in die Zelle (Borrow und Oldstone, 1994). Dieser Prozess wird durch die Bindung an den lysosomalen Rezeptor LAMP1 (*lysosomal associated membrane protein 1*) vermittelt und erfolgt bei einem ungewöhnlich niedrigen pH-Wert von 3-4,5 (Jae et al., 2014; Klewitz et al., 2007a). Durch die Fusion kommt es zur Freisetzung der RNP-Komplexe in das Zytoplasma der Wirtszelle. Die virale RNA-abhängige-RNA-Polymerase L startet mit der frühen Transkription der mRNA für die Proteine L und NP, die anschließend an freien Ribosomen translatiert werden. Die Transkription endet an dem Terminationssignal in der intergenischen Region (Morin et al., 2010). Das Umschalten vom Transkriptionsmodus in den Replikationsmodus hängt vermutlich von der Menge des neu synthetisierten NP ab. Durch das Anlagern des NP an die Genomsegmente ist die virale Polymerase in der Lage, das Antigenom zu synthetisieren und somit Kopien der beiden Genomsegmente in voller Länge herzustellen (Iwasaki et al., 2015). Das Antigenom wird sowohl als Matrize für die Replikation des viralen Genoms verwendet, als auch für die späte Transkription der mRNA für die Proteine Z und PräGPC (Abb. 2.2). Die neu synthetisierten Genomsegmente werden bereits während der Replikation mit dem NP- und L-Protein komplexiert, über NP an das Matrixprotein Z gebunden und an die Zellmembran transportiert (Eichler et al., 2004; Fehling et al., 2012). Das virale Glykoprotein wird an der Membran des endoplasmatischen Retikulums synthetisiert und gelangt nach der Translation über den sekretorischen Weg zur Plasmamembran (Eichler et al., 2006). Das Matrixprotein Z wird über die Interaktion mit dem Motorprotein KIF13A (*kinesin family member 13*) entlang des zellulären Mikrotubuli-Netzwerks zur Zellmembran transportiert (Fehling et al., 2013). Die Interaktion des Z-Proteins mit dem L-Protein führt dazu, dass L an der Promotorsequenz im Genom gebunden bleibt und

die Polymerase-Funktion so gehemmt wird (Kranzusch und Whelan, 2011). Dadurch wird sichergestellt, dass L über die Bindung an die RNP-Komplexe während der Virusknospung und Freisetzung in die Virionen eingebaut wird (Kranzusch und Whelan, 2011; Strecker et al., 2003; Strecker et al., 2006).

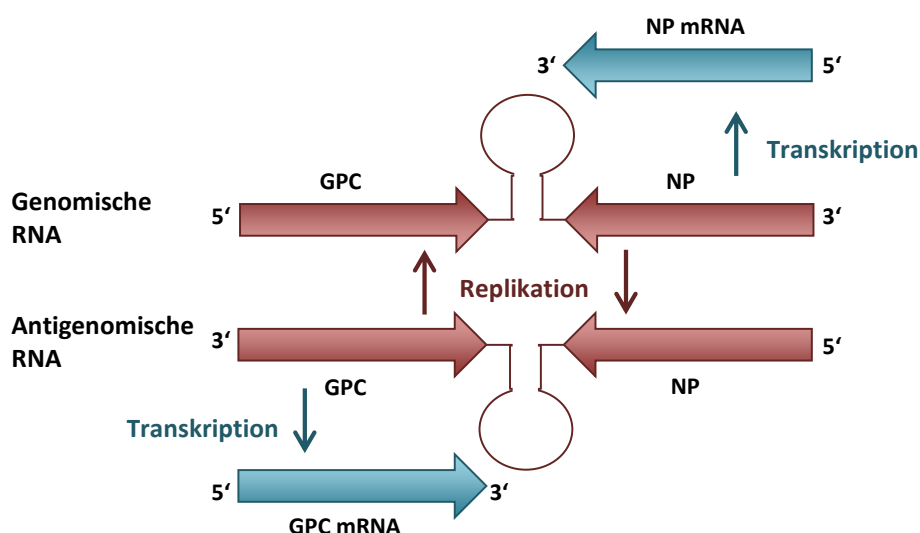


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Transkription und Genomreplikation der Arenaviren. In der frühen Transkription wird der 3'-Bereich des S-Segments in die NP mRNA umgeschrieben, von dem aus das NP translatiert wird. In der Replikation wird ein durchgängiges Antigenom gebildet, das als Matrice für die Synthese der GPC mRNA in der späten Transkription dient. Analog dazu erfolgt die Transkription und Replikation des L-Segments. Schema nach (Doerr und Gerlich, 2010).

2.1.4 Epidemiologie und Pathogenese des LASV

Das LASV, der Erreger des humanen Lassafiebers (LF), wurde erstmals 1969 in der Stadt Lassa im Nordosten Nigerias beschrieben. Das LASV ist in mehreren Ländern Westafrikas endemisch und die jährliche Inzidenz wird auf 100.000 bis 300.000 Fälle mit über 5.000 Todesfällen geschätzt (McCormick, 1987; McCormick et al., 1987b). Während des jüngsten Ausbruchs in Nigeria im Jahr 2020 wurden bislang 1.148 bestätigte Fälle mit einer Letalitätssrate von 20,6% registriert (Control, 2020).

Das natürliche Hauptreservoir des LASV sind chronisch infizierte Nagetiere der Spezies *Mastomys natalensis*, die das Virus über ihren Urin und Kot ausscheiden. Darüber hinaus konnten auch weitere Nagetiere als ein natürliches Reservoir identifiziert werden, wenn auch mit einer deutlichen geringeren Seroprävalenz im Vergleich zu *Mastomys natalensis* (Fichet-Calvet et al., 2014). LASV wird hauptsächlich als Zoonose durch die Nahrungsaufnahme und Inhalation von erregerehaltigen Aerosolen, die mit den infizierten Exkrementen der Nagetiere kontaminiert sind, übertragen (McCormick, 1987). Darüber hinaus stellt der Kontakt mit kontaminiertem Nagetierblut einen potenziellen Übertragungsweg dar, wenn die Hautbarriere nicht mehr intakt ist (Gibb et al., 2017). Die Übertragung von Mensch zu Mensch ist hauptsächlich bei nosokomialen Ausbrüchen dokumentiert

und entsteht vor allem durch den Kontakt mit infektiösen Körperflüssigkeiten wie Blut, Kot, Urin, Rachenabstrichen, Erbrochenem und Speichel (Kernéis et al., 2009; McCormick et al., 1987a).

Nachdem das LASV in den menschlichen Körper gelangt ist, kommt es durch die systemische Streuung über die Lymphbahnen zur Infektion mehrerer Organe, wobei die Leber, Milz, Nieren sowie der Respirationstrakt am stärksten betroffen sind (Walker et al., 1982). Die Inkubationszeit des LF beträgt 3–21 Tage. Schätzungsweise verlaufen 80% der Fälle asymptomatisch, wohingegen bei symptomatischen Verläufen das LF zwischen einem milden Verlauf, bis hin zu einer grippeähnlichen Erkrankung mit Fieber und zahlreichen Symptomen wie Unwohlsein, Kopfschmerzen, Halsschmerzen, Muskelschmerzen, Brustschmerzen, Husten, Übelkeit, Erbrechen, Durchfall und Bauchschmerzen variieren kann (Günther und Lenz, 2004; McCormick et al., 1987a). Das anhaltende Fieber kann in ein fulminantes hämorrhagisches Fieber übergehen und bei Multiorganversagen letal verlaufen (McCormick et al., 1987a). Darüber hinaus führt eine LASV-Infektion in der Schwangerschaft zu einer erhöhten Müttersterblichkeit und Fehlgeburtenrate (Price et al., 1988). Nach einer überstandenen LASV-Infektion sind neurologische Folgeerscheinungen, wie eine aseptische Meningitis und Enzephalopathie sowie Schwerhörigkeit dokumentiert (Ogbu et al., 2007).

Bei der Kontrolle einer LASV-Infektion spielt die T-Zell-vermittelte Immunantwort vermutlich eine zentrale Rolle, da die Bildung von neutralisierenden Antikörpern erst spät in der Rekonvaleszenz einsetzt und auch nur in sehr geringen Titern nachweisbar ist (Jahrling, 1983; Jahrling et al., 1985).

2.1.5 Antivirale Therapie

Das einzige Medikament mit einer nachgewiesenen Wirksamkeit bei einer LASV-Infektion ist das Nukleosidanalogen Ribavirin. Die Behandlung mit Ribavirin ist jedoch nur in einem frühen Stadium der Infektion wirksam und wirkt sich wegen der starken Nebenwirkungen nur bei Patienten mit einer schweren Verlaufsform positiv auf die weitere Prognose aus (Eberhardt et al., 2019; McCormick et al., 1986). Darüber hinaus ist eine unterstützende Therapie notwendig und umfasst dabei Flüssigkeitsersatz, Bluttransfusion, Verabreichung von Schmerzmitteln sowie Breitspektrum-Antibiotika zur Vermeidung bakterieller Sekundärinfektionen (Ogbu et al., 2007).

Derzeit sind noch keine LASV-spezifischen therapeutischen Ansätze oder Schutzimpfstoffe für den Menschen zugelassen. Mehrere LASV GP-basierte Impfstoffkandidaten haben sich jedoch in präklinischen Tierversuchen als wirksam erwiesen. Dazu gehören verschiedene Ansätze, wie beispielsweise attenuierte Lebendimpfstoffe (z.B. die natürliche Reassortante ML29 oder rekombinante Mopeia Viren) (Carnec et al., 2018; Lukashevich et al., 2005), Impfstoffkandidaten auf der Basis von viralen Vektoren (z.B. modifizierte Vaccinia Viren, Vesikuläre Stomatitis Viren (VSV), Masernviren, Tollwut- und Gelbfieberviren) (Abreu-Mota et al., 2018; Bredenbeek et al., 2006; Fisher-Hoch et al., 2000; Fisher-Hoch et al., 1989; Geisbert et al., 2005; Mateo et al., 2019) sowie DNA-basierte Impfstoffe (Cashman et al., 2017; Rodriguez-Carreno et al., 2005).

Neben der prophylaktischen Impfung wird die passive Antikörper-vermittelte Immuntherapie als eine potenzielle Behandlung gegen das LF untersucht. Die Therapie mit Rekonvaleszentenplasmen hat in klinischen und präklinischen Studien kontroverse Ergebnisse gezeigt. In früheren klinischen Studien sowie in Tiermodellen konnte ein abgemildeter Krankheitsverlauf oder sogar ein vollständiger Schutz nach Verabreichung von Rekonvaleszentenplasmen erzielt werden. Dabei hat sich gezeigt, dass der therapeutische Beginn nach der Infektion, die Konzentration der neutralisierenden Antikörper und die antigene Übereinstimmung entscheidend für einen Behandlungserfolg sind (Frame et al., 1984; Jahrling, 1983; Jahrling et al., 1985; Jahrling und Peters, 1984; Jahrling et al., 1984).

Kürzlich zeigten Studien mit monoklonalen Antikörpern, die aus B-Zellen von LF-Überlebenden isoliert wurden und eine hohe Neutralisierungskapazität gegen das LASV GP aufwiesen, vielversprechende Ergebnisse in einem nicht-menschlichen Primatenmodell. Dabei schützte die Verabreichung vor einer letalen LF-Erkrankung und führte sogar in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium zum Überleben der Versuchstiere (Mire et al., 2017).

2.2 Das humane respiratorische Epithel

Der menschliche Respirationstrakt unterteilt sich in die luftleitenden Strukturen und die für den Gasaustausch zuständigen respiratorischen Strukturen. Zu den luftleitenden Strukturen zählen die Nasenhöhle, der Pharynx und Larynx, die Trachea, sowie die Bronchien und Bronchiolen. Zu den respiratorischen Strukturen zählen die respiratorischen Bronchiolen und die Alveolen (Ganesan et al., 2013). Die Innenseite der Atemwege wird von einer kontinuierlichen Epithelschicht ausgekleidet, die je nach Abschnitt in ihrer Zellzusammensetzung und Schichtung variiert (Bérubé et al., 2010). In den oberen Atemwegen und den Bronchien befindet sich das respiratorische Epithel, bei dem es sich um ein hochprismatisches mehrreihiges Epithel handelt, das sich aus Becherzellen, Zilien-tragenden Zellen, sekretorischen Clubzellen und Basalzellen zusammensetzt (Ganesan et al., 2013). Ab der ersten Bronchiengabelung wandelt sich das mehrreihige Epithel in ein einschichtiges Epithel, das durch zunächst hochprismatische und später kubische Zellen charakterisiert ist. Darüber hinaus nimmt der Anteil an Zilien-tragenden Zellen ab, wohingegen die Clubzellen als alleiniger sekretorischer Zelltyp erhalten bleibt (Ganesan et al., 2013). In den Alveolen findet der Gasaustausch statt, weshalb die Epithelzellen dort in direktem Kontakt mit dem Endothel der Kapillaren stehen. Das Epithel der Alveolen setzt sich aus den Pneumozyten Typ I, über die der Gasaustausch erfolgt, und den Pneumozyten Typ II, die das *Surfactant* sezernieren, zusammen (Bérubé et al., 2010).

Die Zilien-tragenden Zellen machen ca. 50% aller Zellen in den luftleitenden Strukturen aus (Spina, 1998) und differenzieren sich aus Basalzellen und Becherzellen (Ayers und Jeffery, 1988). Die Becherzellen sind sekretorisch aktiv und haben im apikalen Bereich des Zytoplasmas Granula, die saure Mucin-Glykoproteine enthalten (Raphael et al., 1989). Die Clubzellen sind ebenfalls sekretorisch aktiv und sezernieren schützendes *Surfactant* Protein, sowie die CCPs (*clara cell proteins*) (Phelps und Floros,

1991; Widdicombe und Pack, 1982). Die Basalzellen sind mit der Basallamina über Hemidesmosomen verbunden und regulieren neben ihrer Funktion als Progenitorzellen, die Immunantwort (Evans et al., 2001; Hajj et al., 2007). Das respiratorische Epithel ist ein Grenzgewebe, das eine mechanische und undurchlässige Barriere darstellt, um den Körper vor schädlichen Einflüssen aus der Umwelt zu schützen (Vareille et al., 2011). Diese Schutzfunktion erfüllt es über drei verschiedene Mechanismen. Durch den mukoziliären Transport werden Schadstoffe und Pathogene abtransportiert (Knowles und Boucher, 2002). Interzelluläre *Tight junctions* (TJ) und *Adherens junctions* (AJ) verhindern eine freie parazelluläre Permeabilität (Pohl et al., 2009). Die Induktion einer Immunantwort und die Freisetzung von anti-mikrobiellen Stoffen aus den respiratorischen Epithelzellen verhindern ein Eindringen von Pathogenen in den menschlichen Körper (Bals und Hiemstra, 2004).

2.2.1 Mukoziliärer Transport im Respirationstrakt

Die apikale Oberfläche der Atemwegsepithelzellen ist von Mukus bedeckt, der hauptsächlich aus Mucin-Glykoproteinen und Wasser besteht und durch die Bildung einer semipermeablen Barriere den Austausch von Nährstoffen, Wasser und Gasen ermöglicht (Rose und Voynow, 2006; Vareille et al., 2011). Die Hauptfunktion des Mukus ist es, fremde Partikel zu binden und über den Zilienschlag und durch Husten aus dem Respirationstrakt zu entfernen (Knowles und Boucher, 2002). Dabei bildet der Mukus zwei unterschiedliche Schichten mit unterschiedlicher Viskosität. Die obere Schicht ist sehr zäh und beinhaltet vor allem lösliche Mucine, wohingegen die untere Schicht die Zilien umspült und weniger zäh ist, sodass die aktive Bewegung der Zilien ermöglicht wird (Button et al., 2012). Im humanen Respirationstrakt kommen vor allem die Mucine MUC5AC, MUC5B, MUC1, MUC4 und MUC16 vor (Sheehan et al., 2006). Die beiden löslichen Mucine MUC5AC und MUC5B werden von sekretorischen Becherzellen, bzw. von submukösen Drüsen sezerniert (Ganesan et al., 2013; Hovenberg et al., 1996), die die Mucine in Form von Sekret-Granula speichern und sie konstitutiv oder auch auf äußere Reize hin sezernieren (Thornton et al., 2008). In Infektionsstudien mit dem respiratorischen Synzytialvirus (RSV) konnte gezeigt werden, dass besonders die Freisetzung von TNF (*tissue necrosis factor*) - α und CXCR (CXC-Motiv-Chemokinrezeptor) 2 zu einer erhöhten MUC5AC-Sekretion führt (Miller et al., 2003; Stokes et al., 2013), oder eine verstärkte Mukus-Expression durch die Proliferation von Mukus-produzierenden Becherzellen entsteht (Persson et al., 2014). Bei MUC1, MUC4 und MUC16 handelt es sich um membrangebundene Mucine, die jedoch durch Spaltung oder alternatives *Splicing* zusätzlich in einer löslichen Form in der oberen Mukusschicht vorkommen (Sheehan et al., 2006). MUC1 befindet sich hauptsächlich auf der Oberfläche von Mikrovilli, während sich MUC4 und MUC16 auf der Oberfläche von Zilien befinden (Hattrup und Gendler, 2008). Bei der Sekretion der Mucine werden zusätzlich gebundene Moleküle freigesetzt, die wichtige Funktionen in der Abwehr von Pathogenen oder inflammatorischen Prozessen erfüllen (Ali et al., 2011). So konnte

z.B. gezeigt werden, dass der humane respiratorische Mukus vor einer Infektion mit porzinen und humanen Influenzaviren (IAV) schützen kann (Cohen et al., 2013; Zanin et al., 2015).

2.2.2 Polare Epithelzellen als mechanische Barriere

Polare Epithelzellen zeichnen sich durch die Unterteilung der Plasmamembran in ein apikales und ein basolaterales Kompartiment aus. Die beiden Kompartimente haben eine unterschiedliche Komposition von Membranproteinen und durch die Ausbildung von TJ wird ein freies Diffundieren der Membranproteine verhindert (Cereijido et al., 1998; van Meer und Simons, 1986). Die TJ befinden sich unterhalb der apikalen Membran und bestehen aus den integralen Proteinen Occludin, Claudin und JAM-A (*Junctional adhesion molecule A*), sowie den peripheren Membranproteinen, wie z.B. den ZO (*zonula occludens*)-Proteinen, die mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden sind (Förster, 2008). Über die Membranbindung an benachbarte Zellen wird der parazelluläre Raum zum Lumen hin abgedichtet und somit der parazelluläre Transport von Ionen und anderen Stoffen reguliert (Coyne et al., 2003). Die Komplexität und Zusammensetzung der TJ ist dabei abhängig vom Zelltyp und Gewebe (Staehein, 1973). Die AJ bestehen aus den Transmembranproteinen E-Cadherin, sowie α - und β -Catenin. Durch E-Cadherin werden die benachbarten Zellen mechanisch miteinander verbunden, während α - und β -Catenin eine Verbindung zu dem Mikrotubuli- und dem Aktin-Zytoskelett herstellen. Die AJ initiieren die Bildung und Reifung von Zell-Zell-Kontakten und sind somit eine Voraussetzung für die Ausbildung der TJ (Ganesan et al., 2013). Die Barrierefunktion des respiratorischen Epithels verhindert den Viruseintritt in die Submukosa und erschwert so den Zugang zu viralen Rezeptoren auf der basolateralen Membran (Bergelson, 2009).

Es wurden jedoch Pathogenitätsmechanismen beschrieben, die einen Verlust der Epithelintegrität verursachen können. Zum einen können respiratorische Viren eine Apoptose in respiratorischen Epithelzellen durch eine direkte Infektion induzieren oder die Produktion und Freisetzung von pro-apoptotischen Botenstoffen anregen (Husain und Harrod, 2009; Mori et al., 1995; Peterhans, 1997). Zum anderen können virale Proteine durch eine direkte Interaktion mit TJ-Proteinen zu einer Umstrukturierung des Zytoskeletts führen bzw. pro-inflammatorische Zytokine, die an TJ-Proteine binden, eine Störung der Zell-Zell-Verbindungen bewirken (Kampf et al., 1999; Sajjan et al., 2008; Singh et al., 2007).

2.2.3 Antivirale Immunantwort im respiratorischen Epithel

Die Detektion von viralen Infektionserregern kann bei respiratorischen Epithelzellen sowohl auf der Oberfläche der Plasmamembran erfolgen, als auch über intrazelluläre zytoplasmatische Sensoren. In Atemwegsepithelzellen konnte gezeigt werden, dass TLR3 (*Toll-like receptor 3*) sowohl auf der luminalen, als auch auf der basalen Membranseite exprimiert wird (Ioannidis et al., 2013). Zusätzlich befinden sich für die Erkennung von viralen Nukleinsäuren TLR3 und TLR7/8 im endosomalen

Kompartiment (Kawai und Akira, 2008). Durch die Bindung der Liganden dsRNA oder ssRNA kommt es schließlich zur Induktion und Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen, sowie Typ I und Typ III IFN (Takeuchi und Akira, 2009; Vaireille et al., 2011). Die Induktion kann aber auch nach der Bindung der Liganden an die zellulären Sensoren RIG-I und MDA5 (*melanoma differentiation-associated protein 5*) erfolgen (Le Goffic et al., 2007). IFN sind die wichtigsten antiviralen Botenstoffe, da die Produktion in virusinfizierten Zellen induziert wird und zusätzlich einen antiviralen Status in den Nachbarzellen induziert. Nach der Bindung an die jeweiligen Rezeptoren induzieren beide Arten von IFN ähnliche Signalkaskaden, die zu einer Expression von ISGs (IFN-stimulierten Genen) führt (Galani et al., 2017; Samuel, 2001; Syedbasha und Egli, 2017).

Typ I IFN bindet dabei an die Rezeptoren IFNAR1 und -2 (Interferon α/β Rezeptor 1 und -2) und Typ III IFN an die Rezeptoren IL10R β (*Interleukin 10 receptor, beta subunit*) und IFNLR1 (*Interferon Lambda receptor 1*), die ein Heterodimer bilden (Miknis et al., 2010; Samuel, 2001). Während die Rezeptoren IFNAR und IL10R β auf zahlreichen Zellen exprimiert werden, wird IFNLR1 fast ausschließlich auf epithelialen Zellen exprimiert. Daher ist die antivirale Funktion von Typ III IFN hauptsächlich auf Epithelzellen beschränkt (Mahlaköiv et al., 2015; Sommereyns et al., 2008). Typ III IFN wird auch bevorzugt bei viralen Infektionen des Respirationstraktes von respiratorischen Epithelzellen freigesetzt (Crotta et al., 2013). Zu den antiviralen Proteinen, die durch IFN induziert werden, zählt u.a. die Proteinkinase R (PKR), die durch dsRNA aktiviert wird und in der infizierten Zelle Apoptose induziert (Vaireille et al., 2011). Weitere ISGs sind beispielsweise die Oligoadenylatsynthetase 1 (OAS1), die durch die Spaltung von ssRNA zur Degradation viraler Nukleinsäuren führt (Player und Torrence, 1998) und das Interferon-induzierte GTP-bindende Protein Mx1 (Mx-Protein), das den intrazellulären Transport viraler Proteine stört und so die virale Replikation hemmt (Haller und Kochs, 2002). Die Epithelzellen der Atemwege produzieren zusätzlich antivirale Botenstoffe, die nicht durch IFN induziert werden, wie z.B. Lactoferrin, welches zelluläre Rezeptoren blockiert oder direkt an die Viruspartikel binden kann (van der Strate et al., 2001); oder Nitritoxide, die die Apoptose induzieren und pro-inflammatorische Prozesse verstärken können (Blaise et al., 2005; Koetzler et al., 2009).

Darüber hinaus sind respiratorische Epithelzellen aktiv an der Immunantwort beteiligt und regulieren diese durch eine spezifische Zytokinfreisetzung. Eine wichtige Funktion der Zytokine ist dabei die Rekrutierung von Immunzellen des angeborenen Immunsystems, wie den neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, natürlichen Killerzellen, sowie Monozyten und Makrophagen, die an der Phagozytose von Viruspartikeln beteiligt sind (Biron et al., 1999; Message und Johnston, 2004). Durch die Wechselwirkung der respiratorischen Epithelzellen mit Zellen des erworbenen Immunsystems wird eine spezifische Immunantwort eingeleitet. Dabei kommt es zur Migration von konventionellen dendritischen Zellen, die unterhalb der Epithelschicht ein Netzwerk bilden und deren Differenzierung und Reifung von den respiratorischen Epithelzellen mitreguliert wird (Rate et al., 2009; Regamey et al.,

2007). Die Migration von T-Helferzellen vom Typ 1 und Typ 2 (T_H1 und T_H2) wird durch die Zytokine der respiratorischen Epithelzellen verstärkt und somit eine Viruseliminierung auf zellulärer Ebene ermöglicht (Vareille et al., 2011). Um eine gewebeschädigende pro-inflammatorische Reaktion zu verhindern, sind die Epithelzellen in der Lage, TGF- β (*transforming growth factor-beta*) zu sezernieren, das zur Aktivierung immunsupprimierender regulatorischer T-Zellen (T_{reg}) führt (von Boehmer, 2005).

2.3 Ziel der Arbeit

Das LASV tritt endemisch in einigen Ländern Westafrikas endemisch auf und führt jährlich zu zahlreichen Todesopfern. Das natürliche Hauptwirtsreservoir des LASV ist die Vielzitzenmaus *Mastomys natalensis*. Diese Tiere sind chronisch infiziert und scheiden das infektiöse LASV über ihre Exkremente aus. Durch den engen Kontakt zum Menschen kommt es über zahlreiche Infektionsrouten zur Übertragung des LASV auf den Menschen. So kann das Virus bei der Zubereitung der Mäuse über Verletzungen der Haut oder die Inhalation erregerehaltiger Aerosole und Staub in den menschlichen Körper gelangen. Zusätzlich kann es durch den Kontakt mit infektiösen Körperflüssigkeiten, wie beispielsweise Sputum zu einer möglichen Mensch-zu-Mensch Übertragung kommen. Eine effektive antivirale Therapie oder ein spezifischer Impfstoff sind bislang nicht zugelassen und die Behandlung einer akuten LF-Erkrankung mit Rekonvaleszentenseren ist nicht immer erfolgreich. Obwohl es schon zahlreiche Pathogenitätsstudien während einer systemischen Infektion von LASV gibt, ist der Mechanismus einer LASV-Infektion im respiratorischen Epithel noch weitestgehend unverstanden.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die LASV-Infektion in den humanen Atemwegen in einem humanen Zellkultursystem aus differenzierten primären bronchialen Epithelzellen zu untersuchen und näher zu charakterisieren. Hierbei lagen die Schwerpunkte auf der Untersuchung der Infektionsroute sowie der gerichteten Virusfreisetzung, da besonders eine apikale Virusfreisetzung zu einer potenziellen LASV-Übertragung über Aerosole führen könnte. Darüber hinaus sollte der Zelltropismus in den humanen Atemwegen bestimmt werden und so die Infektionsrouten in Abhängigkeit der Zugänglichkeit der respiratorischen Epithelzellen für eine LASV-Infektion untersucht werden. Anschließend sollte die LASV-induzierte Immunantwort in Atemwegsepithelzellen analysiert werden, da Epithelzellen zusätzlich zu Typ I IFN auch Typ III IFN als Antwort auf eine Virusinfektion sezernieren können.

Im Hinblick auf einen potenziellen Therapieansatz sollte ferner untersucht werden, ob LASV GP-spezifische Antikörper, die in LASV GP VLP-immunisierten Kaninchen generiert wurden, eine LASV-Infektion in humanen LASV-Zielzellen hemmen können. Im Rahmen dessen sollten die polyklonalen Antikörper detailliert charakterisiert und ihre Spezifität sowie ihre neutralisierenden Eigenschaften gegenüber phylogenetisch unterschiedlichen LASV-Linien untersucht werden.

3. Materialien

3.1 Chemikalien

4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Boehringer Mannheim, Mannheim
Acrylamidlösung Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Biorad, Richmond (USA)
Avicel PH Microcrystalline Cellulose FMC	BioPolymer, Philadelphia
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Corbit	Hecht, Kiel-Hassee
Cryo-Sure DMSO	Merck Eurolab, Darmstadt
Eosin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol (70%, 100%)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Roche, Mannheim
Fluoroshield	bioMerieux, France
Formaldehyd 10%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glyzin	Roth, Karlsruhe
Hämatoxylin nach Mayer	
-Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
- Natriumjodat	Merck, Darmstadt
- Aluminiumkaliumsulfat	Merck, Darmstadt
- Chloralhydrat	Merck, Darmstadt
- Zitronensäure	Merck, Darmstadt
IFN-λ (IL-28A)	PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA
Isopropanol	Sigma Aldrich, Steinheim
Kollagen Typ I (aus Rattenschwanz)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kristallviolett	Merck KGaA, Darmstadt
Magermilchpulver	Töpfer, Dietmannsried
Paraffin	Sakura (Tissue Tek)
Paraformaldehyd (PFA)	Roth, Karlsruhe
Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA)	Sigma Aldrich, Steinheim
Rekombinantes LASV GP1 und GP2 Antigen	The Native Antigen Company, Kidlington, GB
Retinolsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Saccharose	Merck, Darmstadt
Stopplösung	KPL, Gaithersburg, MD, USA
SYPRO™ Ruby Gelfärbung	Invitrogen, Paisley, GB

Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
TMB-Substrat	KPL, Gaithersburg, MD, USA
TransIT-LT 1 Reagenz	Mirus Bio, Madison, USA
Triton X-100	Serva, Heidelberg
TrueBlue	KPL, Gaithersburg, MD, USA
Xylol	Struckmeyer, Hannover
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim

3.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser (24 x 24 mm)	Menzel-Gläser
Einbettungskassetten	Engelbrecht, Edermünde
Einfrierröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Einwegskalpell	Feather, Japan
ELISA-Mikrotiterplatten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Falkon (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Halbmikroküvetten	Lab Logistics Group GmbH, Meckenheim
Kanülen (0,7 x 30 mm)	BD Microlance, Spanien
Nitrozellulose-Membran	Whatman, New Jersey, USA
Objektträger (76 x 26 mm)	Thermo SCIENTIFIC
Parafilm M	Pechiney PlasticPackaging, Chicago
Pasteurpipetten	Hirschmann Laborgeräte,
PCR-Röhrchen, 0,2 ml	Biozym, Hess. Oldendorf
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Transwell-Filtermembran (<i>Transwell Permeable Support</i>) Porengröße: 0,4 μm ; Porendichte: 4×10^6 Poren/ cm^2 ; Wachstumsfläche: 1,12 cm^2)	Corning, New York, USA
UltraClear-Zentrifugenröhrchen für SW 32 Ti Swinging- Bucket Rotor	Beckman Coulter, Brea, USA
Zellkultur Multiwellplatten (6-, 12-, 24-Wells)	Greiner bio-One, Frickenhausen
Zellkulturflasche (75 cm^2 , 175 cm^2)	Corning, New York, USA
Zellschaber	Greiner bio-One, Nürtingen

3.3 Kommerziell erhältliche Reaktionsansätze

Antibody Purification Kit (Protein A)	Abcam, Cambridge, GB
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
Pierce™ BCA™ Protein-Assay	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
QIAmp viral RNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
QuantiTect SYBR® Green RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Taq PCR Master Mix	Qiagen, Hilden

3.4 Geräte

Brutschrank Inkubator C200	Labotect, Göttingen
Centrifuge 5417 R (Tischzentrifuge)	Eppendorf, Hamburg
ChemiDoc Imaging System	BioRad, Hercules, USA
Durchflussszytometer BD FACSCalibur	BDBiosciences, San Jose, USA
Elektrophoreseapparatur, 6 x 8 cm	Keutz, Reiskirchen
Elektrotransferapparatur (Blot-Kammer)	Keutz, Reiskirchen
Epoch Microplate Spectrophotometer	Biotek, Bad Friedrichshall
EVOM ² (Volt-Ohm Meter)	World Precision Instruments
Färbeautomat (Leica)	Medite, Burgdorf
Fluoreszenzmikroskop Axiophot	Zeiss, Jena
GelDoc 2000	Biorad, Richmond, USA
Konfokales Laserscanning Mikroskop TCS SP5 II	Leica, Wetzlar
Lichtmikroskop DMI1	Leica, Wetzlar
Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau
Mikrotom	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Mikrowelle	Bosch, Stuttgart
NanoPhotometer NP80	Implen, München
Objektträger-Schnelltrockner	Medite, Burgdorf
Odyssey Infrared Imaging System LI-COR	Biosciences, Bad Homburg
Paraffin-Ausgießstation	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific
Sterilbank	BDK, Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen

Synergy H1 Multi-Mode-Mikroplatten-Lesegerät
 Thermomixer 5436 (Heizblock)
 Ultrazentrifuge Optima L-100XP mit dem Rotor:
 SW 32 Ti Swinging-Bucket Rotor
 Wasserbad

Biotek, Bad Friedrichshall
 Eppendorf AG, Hamburg
 Beckman Coulter, Brea, USA
 Köttermann Labortechnik,
 Uetze/Hänigsen

3.5 Puffer

10x SDS-Laufpuffer für Trennung von
 Proteinen in Acrylamid-Gelen

 4x Proteinprobenpuffer

 Antikörper-Verdünnungspuffer für Western Blots
 Blockierungspuffer für Mukusinhibitionstest

 Blockierungspuffer für Western Blots
 ELISA -Waschpuffer

 ELISA-Blockierungspuffer

 ELISA-Blockierungspuffer für Antikörperlösungen

 FACS-Puffer

 PBS⁺⁺
 (Phosphatpuffer mit Ca⁺⁺ und Mg⁺⁺ Ionen)

10 g SDS
 30 g Tris-Base
 144 g Glyzin
 ad 1 L dH₂O

 125 mM Tris-HCl pH 6,8
 40% Glycerin
 8% SDS
 2% β-Mercaptoethanol
 10 µg/ml Bromphenolblau

 7% Magermilchpulver (w/v) in PBS^{def}
 0,1% Tween 20
 10% normales Pferdeserum
 in PBS^{def}

 7% Magermilchpulver (w/v) in PBS^{def}
 0,1% Tween 20
 in PBS^{def}

 5% Magermilchpulver (w/v)
 in PBS^{def}

 1% Magermilchpulver (w/v) in
 0,1% Tween 20
 in PBS^{def}

 3% FKS
 2 mM EDTA
 0,001% Natriumazid
 0,5% Saponin
 in PBS^{def}

 0,13 g CaCl₂
 0,1 g MgCl₂
 ad 1 L PBS^{def}

PBS ^{def} , pH 7,0 (Phosphatpuffer ohne Ca ⁺⁺ und Mg ⁺⁺ Ionen)	8 g NaCl 0,2 g KCl 1,15 g Na ₂ HPO ₄ 0,2 g KH ₂ PO ₄ ad 1 L dH ₂ O
Permeabilitätspuffer für Mukusinhibitionstest	10% Triton X-100 100 mM Glyzine in PBS ^{def}
Sammelgelpuffer für SDS-Gele (0,5 M Tris pH 6,8; 0,4% SDS)	60,6 g Tris-Base 4 g SDS ad 1 L dH ₂ O
Fixierungspuffer für SYPRO™ Ruby Gelfärbung	50% Methanol 7% Essigsäure In dH ₂ O
Waschpuffer für SYPRO™ Ruby Gelfärbung	10% Methanol 7% Essigsäure In dH ₂ O
Trenngelpuffer für SDS-Gele (1,5 M Tris pH 8,8; 0,4% SDS)	181,8 g Tris-Base 4 g SDS ad 1 L dH ₂ O
Western Blot Transferpuffer	5,8 g Tris-Base 2,9 g Glyzin 200 ml Ethanol ad 1 L dH ₂ O

3.6 Größenstandard

Page Ruler Prestained Protein-Ladder	MBI-Fermentas, St.Leon-Rot
--------------------------------------	----------------------------

3.7 DNA-Oligonukleotide (Primer)

3.7.1 Virus-spezifische Primer

Bezeichnung	Sequenz	Hersteller
LassaGP-36E2	ACCGGGGATCCTAGGCATTT	eurofins MWG GmbH, Ebersberg
LassaGP-80F2	ATATAATGATGACTGTTGTTCTTTGTGCA	eurofins MWG GmbH, Ebersberg

3.7.2 Zell-spezifische Primer

Bezeichnung	Sequenz	Hersteller
GAPDH_for	ACCACAGTCCATGCCATCAC	eurofins MWG GmbH, Ebersberg
GAPDH_rev	TCCACCACCTGTTGTCGTA	eurofins MWG GmbH, Ebersberg
IFN-α_for	GTGGTGCTCAGCTGCAAGTC	eurofins MWG GmbH, Ebersberg

IFN- α _rev	TGTGGGTCTCAGGGAGATCAC	eurofins MWG GmbH, Ebersberg
IFN- β _rev	GGAAGTCTGCAGCTGCTTA	eurofins MWG GmbH, Ebersberg
IFN- β _for	TGCCTCAAGGACAGGATGAAC	eurofins MWG GmbH, Ebersberg
IFN- λ _for	CGCCTTGAAGAGTCACTCA	eurofins MWG GmbH, Ebersberg
IFN- λ _rev	GAAGCCTCAGGTCCCAATTC	eurofins MWG GmbH, Ebersberg
ISG15_for	GGTCCAGTTGCTGAAAGAGC	eurofins MWG GmbH, Ebersberg
ISG15_rev	TTTCGTCTGGAGATCCTGTA	eurofins MWG GmbH, Ebersberg
ISG56_for	CAGCAACCATGAGTACAAAT	eurofins MWG GmbH, Ebersberg
ISG56_rev	AAGTGACATCTCAATTGCTC	eurofins MWG GmbH, Ebersberg
Mx1_for	CGGTCCTCAGCCTGGTAG	eurofins MWG GmbH, Ebersberg
Mx1_rev	TGGGGGTCCCGAGATATT	eurofins MWG GmbH, Ebersberg
OAS1_for	GCCCTGGGTCAGTTGACTGG	eurofins MWG GmbH, Ebersberg
OAS1_rev	TGAAGCAGGTGGAGAACTCGC	eurofins MWG GmbH, Ebersberg
Tubulin_rev	AATCAGAGTGCTCCAGCGTG	eurofins MWG GmbH, Ebersberg
Tubulin-for	TCAGTGCGTTACTCACCTCG	eurofins MWG GmbH, Ebersberg

3.8 Vektoren und rekombinante Plasmide

3.8.1 Vektoren

pCAGGS	Eukaryotischer Expressionsvektor, erhalten von Dr. P. Palese, New York, USA. Mit freundlicher Genehmigung von Dr. J. Miyazaki, Osaka, Japan (Niwa <i>et al.</i> , 1991)
--------	---

3.8.2 Rekombinante Plasmide

pCAGGS_LASV_GPC	Kodiert für das Glykoprotein des Lassavirus (Stamm Josiah, GenBank NC_004296, Linie IV), von Dr. Oliver Lenz, Institut für Virologie, Marburg (Lenz <i>et al.</i> , 2001)
pCAGGS_LASV_GPC_Lin I	Kodiert für das Glykoprotein des Lassavirus (Stamm Pinneo, GenBank KM822128, Linie I), kommerziell synthetisiert von BaseClear B.V., Niederlande; kloniert in pCAGGS von Dr. Sarah Katharina Fehling
pCAGGS_LASV_GPC_Lin II	Kodiert für das Glykoprotein des Lassavirus (Stamm 803213, GenBank AF181854, Linie II), kommerziell synthetisiert von BaseClear B.V., Niederlande; kloniert in pCAGGS von Dr. Sarah Katharina Fehling
pCAGGS_LASV_GPC_AV	Kodiert für das Glykoprotein des Lassavirus (Stamm AV, GenBank AF246121, Linie V), kommerziell synthetisiert von BaseClear B.V., Niederlande; kloniert in pCAGGS von Dr. Sarah Katharina Fehling
pCAGGS_LASV_GPC_Togo	Kodiert für das Glykoprotein des Lassavirus (Stamm Togo, GenBank LT601602, Linie VII), erhalten von Dr. Svenja Wolff, Institut für Virologie, Marburg (Wolff <i>et al.</i> , 2016)

pCAGGS_LCMV_GPC Kodiert für das Glykoprotein des Lymphozytären Choriomeningitisvirus (Stamm WE, GenBank AAA46265), erhalten von Dr. Winfried Beyer, Institut für Virologie, Marburg (Beyer *et al.*, 2003)

3.9 Enzyme

Endo-β-N-Acetylglukosaminidase H (Endo H)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
N-Glykosidase F (PNGase F)	New England Biolabs, Frankfurt am Main

3.10 Antikörper

3.10.1 Primärantikörper

α231 (gegen LASV Untereinheit GP1)	Kaninchen, polyklonal	Prof. Dr. W. Garten, Institut für Virologie, Marburg
α4, α3 (gegen LASV Untereinheit GP2)	Kaninchen, polyklonal	Prof. Dr. W. Garten, Institut für Virologie, Marburg
α-AC1	Maus, monoklonal	M.C. Georges-Courbot, <i>Unit of Biology of Viral Emerging Infections</i> , Pasteur Institut, Lyon, Frankreich
α-CC16	Kaninchen, polyklonal	BioVendor, Brno, Tschechische Republik
α-CK17	Maus, monoklonal	BD (Progen)
α-CK7	Maus, monoklonal	Dako, Hamburg
α-CK8	Maus, monoklonal	BD (Progen)
α-E-Cadherin	Maus, monoklonal	BD Transduction Laboratories
α-H1N1 IAV	Kaninchen, polyklonal	Dr. Alexander Klimov, <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> , Atlanta, USA
α-H3N2-R2 IAV	Kaninchen, polyklonal	Dr. Alexander Klimov, <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> , Atlanta, USA
α-LASV GP (37.7H)	Human, monoklonal	absolute antibody, Oxford, Großbritannien
α-LASV NP	Kaninchen, polyklonal	Biozol, Eiching
α-MUC16	Kaninchen, polyklonal	Abcam, Cambridge, Großbritannien
α-MUC4	Maus, monoklonal	Abcam, Cambridge, Großbritannien
α-MUC5AC	Maus, monoklonal	Acris, Rockville, USA
α-N (gegen IAV)	Kaninchen, polyklonal	Prof. Dr. W. Garten, Institut für Virologie, Marburg
α-p63	Kaninchen, polyklonal	Abcam, Cambridge, Großbritannien
α-Pan-Zytokeratin	Maus, monoklonal	Millipore, Temecula (USA)

α -TE-7 (Fibroblasten-Zellmarker)	Maus, monoklonal	Merck Millipore, Darmstadt
α -TFF-3	Maus, monoklonal	nanoTools, Teningen
α -Tubulin	Maus, monoklonal	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
α -Tubulin Cy3	Maus, monoklonal	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
α -VSV	Kaninchen, polyklonal	Prof. Dr. W. Garten Institut für Virologie, Marburg
α -ZO3	Kaninchen, polyklonal	Millipore, Kalifornien (USA)

3.10.2 Sekundärantikörper

α -Human HRP	Kaninchen, polyklonal	Agilent, Santa Clara, USA
α -Kaninchen HRP	Ziege, polyklonal	Agilent, Santa Clara, USA
α -Kaninchen, Alexa Fluor 488	Huhn, polyklonal	MolecularProbes, Karlsruhe
α -Kaninchen, Alexa Fluor 568	Ziege, polyklonal	MolecularProbes, Karlsruhe
α -Kaninchen, Alexa Fluor 680	Ziege, polyklonal	MolecularProbes, Karlsruhe
α -Maus, Alexa Fluor 488	Huhn, polyklonal	MolecularProbes, Karlsruhe
α -Maus, Alexa Fluor 568	Ziege, polyklonal	MolecularProbes, Karlsruhe
α -Maus, IRDye 800	Ziege, polyklonal	Rockland, Gilbertsville (USA)
α -Meerschweinchen FITC	Kaninchen, polyklonal	Dako, Dänemark

3.11 Zellkultur

3.11.1 Zelllinien

<i>Permanente Zelllinien</i>	<i>ATCC Cat. No/erhalten von</i>
A549 - Humane Lungenkarzinomzellen	CCL-185
BHK-Zellen (Baby Hamster Nierenfibroblasten)	CCL-10
HFF - engl. <i>Human foreskin fibroblast</i> für humane Vorhautfibroblasten	SCRC-1041
HuH7 - Humane Hepatomazellen	CCL-185
MDCK II LASV GP-Zellen (Hundenierenepithelzellen, stabil transfiziert mit LASV GP)	Dr. Katrin Schlie, Institut für Virologie, Marburg
MDCK II-Zellen (Hundenierenepithelzellen)	CRL-2936
THP-1-Zellen (Humane Neuroblastomzellen)	TIB-202
Vero E6 - Epithelzelllinie aus der Niere der afrikanischen grünen Meerkatze (<i>Chlorocebus</i>)	CRL-1587
<i>Primäre humane Zellen</i>	
HBEpC - Humane primäre bronchiale Epithelzellen	Provitro, Berlin
NHBE - Humane Bronchiale/Tracheale Epithelzellen	Lonza, Basel, Schweiz

NHBE - Humane Bronchiale/Tracheale Epithelzellen für ALI-Zellkultur

Lonza, Basel, Schweiz

3.11.2 Zellkulturmedien

1x modified Eagle's medium (MEM)

Gibco, Karlsruhe

2x modified Eagle's medium (MEM)

Gibco, Karlsruhe

BEGM Bronchial Epithelial Cell Growth Medium BulletKit

Lonza, Basel, Schweiz

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

Gibco, Karlsruhe

Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12 nutrient Mixture (Ham) (DMEM/F12)

Gibco, Karlsruhe

Fötales Kälberserum (FKS)

Gibco, Karlsruhe

Glasgow's modified Eagle's medium (GMEM)

Gibco, Karlsruhe

L-Glutamin (200 mM)

Gibco, Karlsruhe

Natriumpyruvat

PanBiotech, Aidenbach

Non Essential Amino Acid (NEAA)

PanBiotech, Aidenbach

OptiMEM

Gibco, Karlsruhe

Penicillin/Streptomycin (5000 IU/ml)

Gibco, Karlsruhe

ReagentPack mit Trypsin/EDTA, Trypsin-Neutralisationslösung, HEPES Puffer

Lonza, Basel, Schweiz

RPMI 1640

PanBiotech, Aidenbach

Trypsin/EDTA

Gibco, Karlsruhe

Airway Epithelial Cell Basal Medium

PromoCell, Heidelberg

Airway Epithelial Cell Growth Medium Supplement Mix

PromoCell, Heidelberg

3.12 Viren

Rekombinantes Vesikuläres Stomatitis Virus LASV GP (VSVΔG/LASVGP)

Beide Viren erhalten von Dr. U. Ströher, Public Health Agency of Canada, Winnipeg, Kanada (Garbutt et al., 2004)

Wildtypisches Vesikuläres Stomatitis Virus (VSV)

Beide Viren erhalten von Dr. U. Ströher, Public Health Agency of Canada, Winnipeg, Kanada (Garbutt et al., 2004)

Lassavirus Stamm Josiah

Lassavirus aus Sierra Leone (GenBank P08669) Erhalten von Dr. J. ter Meulen, Bernhard Nocht Institut für Tropenmedizin, Hamburg

Rekombinantes Influenza A Virus H3N2-R2

Beide Viren erhalten von Dr. M. Matrosovich, Institut für Virologie, Marburg (Gerlach et al., 2012; Matrosovich et al., 2007)

Pandemisches Influenza A Virus H1N1 (A/Hamburg/5/2009)

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 RNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen

Für die Isolierung der Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen wurde das *RNeasy Mini Kit* von Qiagen entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Die verwendeten Zellen wurden dafür in Zellkulturplatten oder Transwell-Filtern ausgesät und bis zur Ausbildung eines konfluenten bzw. ausdifferenzierten Zellrasens kultiviert. Nach dem Abnehmen des Mediums wurden die Zellen mit PBS^{def} gewaschen. Danach wurden 350 µl RLT-Puffer mit β-Mercaptoethanol, auf die Zellen gegeben, für 5 min inkubiert und die Zellen anschließend mit einem Zellschaber vom Plattenboden bzw. Filter gelöst. Durch mehrmaliges Aufziehen in einer Kanüle mit einem Durchmesser von 0,9 mm oder einer Pipettenspitze wurden die Zellen homogenisiert und anschließend mit 350 µl Ethanol (abs.) versetzt. Das Zelllysate wurde über eine Säulenmatrix aufgereinigt und in 30 µl RNase freiem Wasser eluiert. Der RNA-Gehalt wurde mit dem Nanophotometer NP80 bestimmt.

4.1.2 Synthese der komplementären DNA (cDNA)

Um die gesamte RNA, nach der RNA-Isolierung aus dem Zelllysate, durch die reverse Transkriptase in cDNA umzuschreiben wurden *Random Hexamer Primer* verwendet, die unspezifisch RNA binden. Die anschließende *Real Time PCR* ermöglicht im Anschluss die Bestimmung des Anteils viraler RNA aus dem Zelllysate bzw. des Expressionsniveaus eines entsprechenden Gens auf zellulärer mRNA-Ebene.

Reaktionsansatz:

RNA-Eluat	10,5 µl
Random Hexamer Primer	2 µl
➔ Vorinkubation für 5 min bei 65°C	
➔ Vorinkubation für 10 min auf Eis	
5x RT-Puffer	4 µl
dNTPs	2 µl
Reverse Transkriptase	0,5 µl
RiboLock RNase Inhibitor	0,5 µl

Parameter im PCR Cyclor:

Synthese des komplementären DNA Strangs	25°C 10 min
Abbau des RNA Strangs	42°C 60 min
Synthese des DNA-Doppelstrangs	70°C 10 min
	4°C ∞

4.1.3 Quantitative *Real Time* PCR (qPCR)

Diese Methode beruht auf dem Prinzip der PCR, bei der es durch die Verwendung spezifischer Primer zu der Amplifikation eines definierten DNA-Abschnittes kommt. Durch die Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes *SYBR Green* wird die Quantifizierung der neu amplifizierten DNA-Doppelstränge ermöglicht. *SYBR Green* interkaliert in die DNA durch die Bindung an die kleine Furche des Doppelstranges, wodurch ein Fluoreszenz-Signal erzeugt wird. Am Ende der Elongation in jedem Zyklus wird die Fluoreszenzintensität gemessen. Durch die exponentielle Zunahme an doppelsträngiger DNA nach jedem Zyklus, nimmt auch das Fluoreszenzsignal exponentiell zu. Der Zyklus, ab welchem die gemessene Fluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz übersteigt, wird als C_T -Wert (engl. *Cycle Threshold* für Schwellenwert-Zyklus) bezeichnet und lässt relative Rückschlüsse auf die Ausgangsmenge der eingesetzten cDNA zu. Mit Hilfe der Software *StepOne Quantitative PCR System* wurde der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Wert bestimmt. Bei jedem Durchgang wurden die Proben im Triplikat untersucht und deren Mittelwerte für die anschließende Auswertung verwendet. Zur Überprüfung der Spezifität der PCR-Produkte wurde im Anschluss an die PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dazu wurden die amplifizierten Doppelstränge durch langsames Erhitzen in 0,3°C-Schritten denaturiert und die Fluoreszenz gemessen, die anschließend als spezifische Schmelzkurve dargestellt wurde.

Reaktionsansatz:

SYBR Green ROX qPCR, 2x Mastermix	12,5 µl
Primer_for	1 µl
Primer_rev	1 µl
cDNA	5 µl
dH ₂ O	5,5 µl

Zyklusparameter:

Initialer Aktivierungsschritt	95°C 10 min	} 40 Zyklen
Denaturierung	95°C 15 min	
Hybridisierung	58°C 15 Sek	
Elongation	72°C 30 Sek	

Relative Schmelzkurve im Anschluss mit schrittweiser Temperaturerhöhung:

95°C (15 Sek) → 60°C (1 min) → (...+0,3°C...) → 95°C (15 Sek)

4.1.4 Einstufige Quantitative *Real Time* PCR

Bei diesem Verfahren erfolgt die cDNA-Synthese und die anschließende quantitative PCR in einem Reaktionsansatz. Die RNA-Isolierung aus dem Zelllysate erfolgte wie zuvor beschrieben. Für die entsprechende Amplifikation wurde das *QuantiTect SYBR® Green RT-PCR Kit* von Qiagen entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

Reaktionsansatz:

2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix	25 µl
Primer_for	2 µl
Primer_rev	2 µl
QuantiTect RT Mix	0,5 µl
RNA	10 µl
H ₂ O	10,5 µl

Zyklusparameter:

Reverse Transkription	50°C 30 min	} 45 Zyklen
Initialer Aktivierungsschritt	95°C 15 min	
Denaturierung	94°C 15 Sek	
Hybridisierung	58°C 30 Sek	
Elongation	72°C 30 Sek	

Relative Schmelzkurve im Anschluss mit schrittweiser Temperaturerhöhung:

95°C (15 Sek) → 60°C (1 min) → (...+0,3°C...) → 95°C (15 Sek)

4.2 Proteinbiochemische und immunologische Methoden**4.2.1 Lyse von eukaryotischen Zellen**

Die Zellen wurden in die jeweiligen Zellkulturplatten oder Transwell-Filter ausgesät und nach Erreichen der gewünschten Konfluenz entsprechend der Fragestellung behandelt. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS^{def} gewaschen. Nach dem Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturplatte mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen in 1 ml PBS^{def} resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden für 5 min bei 8.000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 4x Proteinprobenpuffer (PP) aufgenommen. Die Proben wurden anschließend bei 95°C für 5 min aufgekocht. Die Proben wurden bis zur immunchemischen Auswertung mittels SDS-PAGE und Western Blot bei -20°C gelagert.

4.2.2 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Hierbei werden Proteine in einem elektrischen Feld in Abhängigkeit ihrer molekularen Masse aufgetrennt. Die Proteine werden dazu in 4x PP aufgenommen, der das anionische Detergenz Sodiumdodecylsulfat (SDS) und den reduzierenden Stoff β-Mercaptoethanol enthält. SDS bewirkt eine Entfaltung der Proteine in die Primärstruktur und umgibt die Proteine mit einer einheitlichen negativen Ladung. Die reduzierende Wirkung von β-Mercaptoethanol hat zur Folge, dass sich die Disulfidbrücken innerhalb der Proteine lösen. Das Erhitzen der Probe auf 95°C bewirkt, dass sich zusätzlich nichtkovalente Wasserstoffbrückenbindungen lösen. Somit ist die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im Gel nur noch von der Molekülmasse abhängig. Zur Beurteilung der Molekulargewichtsgröße der entsprechenden Proteine wurde der Größenstandard *Page Ruler Prestained Protein Ladder* verwendet.

Für die Auftrennung der Mukusproteine wurde ein 8%iges Trenngel und ein 4%iges Sammelgel verwendet. Für die Auftrennung des lassaviralen Glykoproteins wurden ein 12%iges Trenngel und ein 4%iges Sammelgel verwendet. Die Gele liefen bei 150 V für ca. 1 h bis der Bromphenolblaufarbstoff aus dem Probenpuffer aus dem Gel ausgetreten war. Die Proteine in den Gelen wurden anschließend mittels Western Blot-Verfahren analysiert.

Gelzusammensetzung für je 2 Gele

Trenngel	8%	12%	Sammelgel	4%
H ₂ O	4,6 ml	3,3 ml	H ₂ O	2,9 ml
1,5 M Tris/0,4% SDS pH 8,8	2,6 ml	2,6 ml	1,5 M Tris/ 0,4% SDS pH 6,8	1,3 ml
30% Acrylamid	2,7 ml	4 ml	30% Acrylamid	750 µl
10% APS	80 µl	80 µl	10% APS	80 µl
TEMED	20 µl	20 µl	TEMED	20 µl

4.2.3 Proteingelfärbung

Nach der Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld mittels SDS-PAGE können diese durch einen Fluoreszenzfarbstoff, der an basische Aminosäuren bindet, angefärbt werden. Dazu wurde das Proteingel zunächst mit 100 ml Fixierungspuffer 2x für je 30 min bei Raumtemperatur (RT) schwenkend inkubiert. Anschließend wurde das Gel über Nacht mit 60 ml des *SYPRO Ruby protein gel stain* von Thermo Fisher Scientific gefärbt. Nach einem einmaligen Waschschrift mit 100 ml des Waschpuffers für 30 min bei RT wurde das Proteingel anschließend 2x mit entionisiertem Wasser gespült und mittels *ChemiDoc Imaging System* von Biorad ausgewertet.

4.2.4 Elektrotransfer der Proteine auf Nitrozellulosemembran (Western Blot)

Die Methode des Western Blots (Immunoblot) dient dem Nachweis von Proteinen mit Hilfe spezifischer Antikörper. Dazu werden die Proteine aus dem Gel im Anschluss an die Gelelektrophorese durch Anlegen einer Spannung auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Die Membran befindet sich zwischen dem Gel und der positiv geladenen Anode. Bei der sogenannten *semidry* Methode wird der Stromfluss durch in Puffer getauchte Filterpapiere, die die Membran und das Gel umgeben, ermöglicht. Die negativ geladenen Proteine wandern in Richtung der positiv geladenen Anode und bleiben so auf der Membran haften. Das sog. „Blotten“ erfolgte für 1 h bei 0,8 mA/cm², bzw. für die Übertragung der Mukusproteine für 2 h bei 0,8 mA/cm².

4.2.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf einer Nitrozellulose-Membran

Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurde die Nitrozellulose-Membran mit 7%iger Milchpulverlösung in PBS^{def} für 30 min bei RT und unter Schwenken inkubiert. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper inkubiert. Dazu wurde der Primärantikörper 1:1.000 in 7%iger Milchpulverlösung verdünnt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS^{def} wurde die

Membran für 1 h bei RT und unter Schwenken mit einem fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Dieser wurde 1:5.000 in 7%iger Milchpulverlösung verdünnt. Der Immunoblot wurde am *Odyssey Infrared Imaging System LI-COR* mit dem Programm *Image Studio Lite Ver 3.1* ausgewertet.

4.2.6 Indirekte Immunfluoreszenz-Analysen von unpolaren Zellen

Für den spezifischen Nachweis von zellulären Proteinen in intakten Zellen wurden Deckgläschen in eine Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen gelegt und die Zellen darauf bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert. Um Rückstände vom Medium zu entfernen, wurden die Zellen zunächst mit PBS⁺⁺ und anschließend 3x mit PBS^{def} gespült. Für die Fixierung wurden die Zellen mit 300 µl 4%igem PFA in DMEM für 20 min bei RT fixiert und anschließend 3x mit PBS^{def} gespült. Zum Absättigen der reaktiven Aldehydgruppen des PFA wurden die Zellen mit 0,1 M Glyzin in PBS⁺⁺ für 10 min bei RT inkubiert und erneut 3x mit PBS^{def} gewaschen. Um intrazelluläre Proteine für die primären Antikörper zugänglich zu machen, wurden die Zellen mit 300 µl 0,1% Triton X-100 in PBS^{def}, einem nichtionischen Detergenz, für 10 min bei RT permeabilisiert und danach ebenfalls 3x mit PBS^{def} gespült. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurden die Zellen in 300 µl 0,2% BSA in PBS^{def} für 20 min bei RT inkubiert. Die Inkubation mit den primären und sekundären Antikörpern erfolgte in einer feuchten Kammer für 1 h bei RT. Dazu wurde der Primärantikörper 1:100 in PBS^{def} verdünnt und je 20 µl der Antikörperlösung für ein Deckgläschen verwendet. Danach wurde erneut 3x mit PBS^{def} gewaschen, um die ungebundenen Primärantikörper zu entfernen. Die fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper wurden 1:200 in 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (50 µg/ml in PBS^{def}) verdünnt. Vor dem Eindecken mit *Fluoroshield* wurde das Deckgläschen 1x mit PBS^{def} und 1x mit dH₂O gewaschen und anschließend mit der Zelleseite nach unten auf den Objektträger aufgelegt. Die Auswertung erfolgte an den Fluoreszenzmikroskopen *Apotom* der Firma Zeiss und am Konfokalen Laser Scanning Mikroskop (KLSM) der Firma Leica.

4.2.7 Indirekte Immunfluoreszenz-Analysen von polaren Zellen

Mit dieser Methode wurde die Lokalisation spezifischer zellulärer bzw. viraler Proteine in polaren Epithelzellen untersucht. Dafür wurden HBEPc auf Transwell-Filter ausgesät und bis zur Ausbildung eines differenzierten Phänotyps unter ALI (engl. *air liquid interface* für Grenzfläche zwischen Luft und Flüssigkeit)- Bedingungen kultiviert (siehe 4.4.4). Die Zellen wurden vor der Färbung zunächst 3x mit PBS⁺⁺ gespült, um die Zell-Zellverbindungen zu festigen und Reste des Zellkulturmediums zu entfernen. Für die spezifische Färbung von zellulären oder viralen Proteinen nach einer Infektion wurde der Filter aus dem Kunststoffrahmen gelöst, in eine Zellkulturplatte mit 12 Vertiefungen überführt und mit 4%igem PFA in DMEM für 20 min bei RT fixiert. Danach wurden die Zellen 3x mit PBS^{def} gespült, anschließend mit 0,1 M Glyzin in PBS⁺⁺ für 10 min bei RT inkubiert, um die reaktiven Aldehydgruppen zu inaktivieren und erneut 3x mit PBS^{def} gespült. Um die Zellmembran permeabel für Antikörper zu

machen, wurden die Zellen mit 300 µl 0,1% Triton X-100 in PBS^{def} für 10 min bei RT inkubiert und anschließend 3x mit PBS^{def} gespült. Der Filter wurde danach mit Hilfe eines Skalpells in vier gleich große Stücke geschnitten. Die Inkubation mit den primären und sekundären Antikörpern erfolgte in einer feuchten Kammer für 1,75 h bzw. 1,5 h bei 4°C. Bei einer Färbung im BSL4-Labor wurden die Filter nicht zerschnitten und für 1 h bzw. 0,75 h bei RT mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. Der Primärantikörper wurde je nach Herstellerangaben in 0,2% BSA in PBS^{def} verdünnt und der Sekundärantikörper 1:200 in DAPI (50 µg/ml in PBS^{def}). Vor dem Eindecken mit *Fluoroshield* wurden die Zellen 1x mit PBS^{def} und dH₂O gewaschen. Die Membran wurde mit der Zellseite nach oben auf einem Objektträger gelegt und mit einem Deckglas eingedeckt. Die Auswertung erfolgte an den Fluoreszenzmikroskopen *Apotom* der Firma Zeiss und am Konfokalen Laser Scanning Mikroskop (KLSM) der Firma Leica.

4.2.8 Quantifizierung von IgG-Antikörpern

4.2.8.1 Immunoperoxidase Monolayer Assay (IPMA)

Für die Bestimmung von LASV GP-spezifischen IgG-Antikörpern wurden zunächst 2×10^2 Vero E6-Zellen in eine Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen ausgesät und nach Erreichen einer Konfluenz von 100% mit 800 PFU VSVΔG/LASVGP pro Vertiefung infiziert. Für die uninfizierte Kontrolle wurde die gleiche Menge DMEM ohne Virus eingesetzt. Nach 1 h wurde das Inokulum abgenommen, frisches Zellkulturmedium dazugegeben und die Zellen für weitere 24 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 4% PFA für 20 min bei RT fixiert, mit 0,1 M Glyzin für 10 min bei RT inkubiert und mit 0,1% Triton X-100 für 10 min bei RT permeabilisiert. Die zu untersuchenden Kaninchenserum Rb#347_D77 und Rb#350_D77 wurden seriell von 1:16 bis 1:32.768 in 0,2% BSA in PBS^{def} verdünnt. Als Positivkontrolle wurde der LASV GP-spezifische polyklonale Kaninchen Antikörper α4 verwendet. Jeder Verdünnungsansatz wurde in eine entsprechende Vertiefung gegeben und die fixierten Zellen wurden mit den Antikörpern für 1 h bei RT inkubiert. Für den Nachweis der gebundenen Primärantikörper wurden die Zellen anschließend für 1 h bei RT mit einem anti-Kaninchen Meerrettichperoxidase (HRP für engl. *horseradish peroxidase*)-gekoppelten Sekundärantikörper, der 1:1.000 in Blockierungspuffer verdünnt wurde, inkubiert. Für die Färbung der infizierten Zellen wurde *TrueBlue* dazugegeben und für 30-60 min bei RT inkubiert. Zum Schluss wurden die Zellen 3x mit entionisiertem Wasser gespült. Der Antikörpertiter wurde aus dem Kehrwert der letzten Serumverdünnung berechnet, bei der noch eine positive Färbung festgestellt werden konnte und als Mittelwert von drei unabhängigen Versuchen angegeben.

4.2.8.2 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Für den Nachweis von LASV GP-spezifischen IgG-Antikörpern in humanen Serumproben wurden aufgereinigte LASV GP VLPs (siehe 4.3.3) für die Beschichtung der hochbindenden ELISA-

Mikrotiterplatten (MTP) verwendet. Um das Hintergrundsignal vom spezifischen Messwert abziehen zu können, wurden MTP mit dem Zellkulturüberstand von Zellen, die LASV GP nicht exprimieren (Mock), beschichtet. Beide Überstände (VLPs und Mock) wurden auf 2,5 µg/ml in PBS^{def} verdünnt, je 50 µl pro Vertiefung gegeben und für 20 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die MTP mit dem ELISA-Waschpuffer gespült und zum Absättigen von unspezifischen Bindungsstellen für 45 min mit einer 5%igen Milchpulverlösung inkubiert. Die humanen Seren wurden 1:200 in Blockierungspuffer verdünnt und für 1 h bei RT inkubiert. Nach dem die MTP 3x mit dem ELISA-Waschpuffer gespült wurden, wurde ein HRP-gekoppelter anti-human Sekundärantikörper 1:1.000 in Blockierungspuffer verdünnt und für 1 h bei RT inkubiert. Für die Farbreaktion zur indirekten Detektion der gebundenen Antikörper wurde TMB-Substrat für 10 min bei RT inkubiert und die Indikatorreaktion durch die Zugabe einer Stopplösung beendet. Die optische Dichte (OD) wurde bei 450–650 nm an dem *Synergy H1 Multi-Mode*-Mikroplatten-Lesegerät gemessen. Jede Probe wurde in Doppelbestimmung analysiert und vom Mittelwert wurde der mittlere OD-Wert der Mock-beschichteten MTP abgezogen. Zur internen Kontrolle und Vergleichbarkeit der verschiedenen Durchläufe wurde eine Standardkurve aus dem kommerziell erhältlichen, humanen LASV GP-spezifischen monoklonalen Antikörper 37.7H erstellt. Für die Ermittlung des Grenzwertes wurden 96 humane Plasmaproben von deutschen Blutspendern verwendet. Der Grenzwert wurde als Mittelwert plus der doppelten Standardabweichung festgelegt und die Gesamtantikörpertiter wurden als OD 450 nm ausgedrückt. Für die Quantifizierung von LASV GP-spezifischen IgG- Antikörpern in den Kaninchenseren Rb#374 und Rb#350 wurde ebenfalls ein ELISA verwendet. Für die Beschichtung der MTP wurde rekombinantes LASV GP1 und GP2 des LASV-Stammes GA391 mit humanem Fc-Tag verwendet. Die rekombinanten Proteine wurden in PBS^{def} auf 2,5 µg/ml verdünnt, 50 µl pro Vertiefung in die MTP gegeben und für 16 h bei 4°C inkubiert. Die zu untersuchenden Kaninchenseren und die Kontroll-Kaninchenseren α231, α3 und ein naïves Kaninchenserum, wurden 1:200 im Blockierungspuffer verdünnt und für 1 h bei RT inkubiert. Die gebundenen Antikörper wurden mit einem polyklonalen anti-Kaninchen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper, der 1:1.000 in Blockierungspuffer verdünnt wurde, nachgewiesen. Nach 10 min Inkubation mit TMB und Zugabe der Stopplösung wurde die OD bei 450 nm am *Epoch Microplate Spectrophotometer* gemessen. Jede Probe wurde in Doppelbestimmung analysiert und die mittleren OD-Werte von drei unabhängigen Messungen wurden bestimmt. Der Grenzwert wurde als Mittelwert plus 10% des Messwertes von naïven Kaninchenseren berechnet und die Antikörpertiter wurden als OD 450 nm ausgedrückt. Die statistische Analyse wurde mit der *GraphPad Prism*-Software Version 8 durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde mit einem ungepaarten t-Test (Signifikanz bei p-Wert < 0,05) berechnet.

4.2.9 Aufreinigung von IgG-Antikörpern aus Kaninchenserum

Diese Methode wurde verwendet, um die IgG-Antikörper aus den Kaninchenserum Rb#347_D77 und Rb#350_D77 über Affinitätssäulen aufzureinigen und anzureichern. Dafür wurde das *Antibody Serum Purification Kit (Protein A)* von Abcam entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Die Elution der Antikörper wurde jedoch in fünf Fraktionen, und nicht wie vom Hersteller angegeben, in drei Fraktionen durchgeführt. Für die Bestimmung der Antikörperkonzentrationen wurde das *Pierce BCA-Protein-Assay-Kit* von *Thermo Fisher Scientific* nach den Herstellerangaben verwendet und die Messung erfolgte am NanoPhotometer NP80. Um auszuschließen, dass die jeweiligen Fraktionen mit anderen Serumproteinen, wie z.B. Albumin, kontaminiert sind, wurde eine SDS-PAGE mit anschließender Proteingelfärbung (siehe 4.2.3) durchgeführt. Die IgG-Präparationen werden im Folgenden als Rb#347_D77+ und Rb#350_D77+ bezeichnet.

4.2.10 Verdau mit Endoglykosidasen

Um die Sensitivität von LASV GP gegenüber Endoglykosidasen zu untersuchen und somit das Glykosylierungsmuster von GP bei LASV Partikeln mit dem Muster von GP bei LASV GP VLPs zu vergleichen wurde ein enzymatischer Verdau durchgeführt. Die Virusanzucht und Aufreinigung wird in 4.5.3, die Herstellung und Gewinnung von LASV GP VLPs in 4.3.4 beschrieben. Die in PBS^{def} resuspendierten Viruspartikel und VLPs wurden mit 4x PP versetzt und mit den Endoglykosidasen Endo β -N-Acetylglukosaminidase H (EndoH) oder N-Glykosidase F (PNGaseF) von der Firma New England Biolabs nach den Herstellerangaben enzymatisch verdaut. Anschließend wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im anschließenden Western Blot die beiden Untereinheiten GP1 und GP2 spezifisch detektiert.

4.3 Zellkulturtechniken mit eukaryotischen Zelllinien

4.3.1 Langzeitlagerung und Auftauen von eukaryotischen Zelllinien

Eukaryotische Zellen können langfristig in der Gasphase oberhalb von flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert werden. Dazu wurde zunächst der konfluente Zellrasen einer 75 cm² Zellkulturflasche mit 3 ml Trypsin/EDTA gelöst, die abgelösten Zellen nach Zugabe von 7 ml Zellkulturmedium resuspendiert und für 5 min bei RT und 1.500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand dekantiert und das Zellpellet in 4,5 ml Einfriermedium resuspendiert. Dieses Medium besteht aus dem üblichen Zellkulturmedium, sowie 20% FKS und 10% DMSO. Letzteres verhindert die Bildung von Eiskristallen, wodurch die Zellen intakt bleiben und nach dem Auftauen wieder in Kultur genommen werden können. Je 1,5 ml dieser Zellsuspension wurde in ein 2 ml Einfrierröhrchen aliquotiert, für 24 h in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox bei -80°C langsam heruntergekühlt und anschließend zur Langzeitlagerung in den Stickstofftank überführt. Für die Inkulturnahme der Zellen wurde das Einfrierröhrchen in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und die Zellen in eine 75 cm²

Zellkulturflasche, in der bereits Zellkulturmedium vorgelegt war, überführt. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt, um die nicht adhärenen Zellen und das DMSO aus dem Einfriermedium zu entfernen. Das Medium wurde anschließend alle 72 h gewechselt und die Zellen nach Erreichen einer Konfluenz von 100% passagiert.

4.3.2 Passagieren und Aussäen von eukaryotischen Zelllinien

Die Zellen wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Für das Passagieren wurden die Zellen mit 10 ml PBS^{def} gespült und anschließend mit 3 ml Trypsin/EDTA im Brutschrank inkubiert. Sobald sich alle Zellen vom Boden der Zellkulturflasche gelöst hatten, wurde die Trypsinierungsreaktion durch die Zugabe von 7 ml des entsprechenden Zellkulturmediums (siehe Tabelle unten) gestoppt und die Zellen darin resuspendiert. Alle verwendeten Zelllinien wurden 2x wöchentlich 1:10 in 75 cm² Zellkulturflaschen umgesetzt. Die verschiedenen Zelllinien wurden in den jeweiligen Zellkulturmedien kultiviert (Tab. 4.1).

Tab. 4.1: Zellkulturmedien und Zusätze für die Kultivierung von eukaryotischen Zelllinien

Zelllinie	Zellkulturmedium	Zusätze
16HBE14o-Zellen	DMEM/F12	10% FKS, 2 mM Glutamin, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin
A549-, Vero E6- und HuH7-Zellen	DMEM	
MDCK II-Zellen	1x MEM	
BHK-Zellen	GMEM	10% FKS, 2 mM L-Glutamin, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 1 × NEAA und 5% Tryptosephosphate
THP-1-Zellen	RPMI 1640	10% FKS, 2 mM L-Glutamin, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 1 × NEAA und Natriumpyruvat. 200 nM PMA für die Differenzierung.

4.3.3 Transfektion eukaryotischer Zellen mit TransIT-LT 1 Reagenz

TransIT wird für die Transfektion verwendet, um die Aufnahme von Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen zu ermöglichen. In der Zelle kommt es dann zur Expression des auf dem Plasmid kodierten Proteins. Für die Transfektion wurden Vero E6-Zellen in eine Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen und darin befindlichen Deckgläschen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 70-80% kultiviert. Die Transfektion wurde den Herstellerangaben (Mirus) entsprechend durchgeführt. Dafür wurde pro Vertiefung 1 µg DNA und die entsprechende Menge TransIT in 100 µl OptiMEM eingesetzt und bei RT für 20 min inkubiert. Das Zellkulturmedium wurde unmittelbar vor der Transfektion gegen Zellkulturmedium mit 2% FKS ausgetauscht und der Transfektionsansatz direkt ins Medium gegeben. Nach 4 h wurde das Transfektionsmedium gegen Zellkulturmedium mit 2% FKS ausgetauscht und nach 48 h konnte die Expression in der indirekten Immunfluoreszenz (siehe 4.2.6) analysiert werden.

4.3.4 Herstellung von LASV GP-induzierten Virus-ähnlichen Partikeln (VLPs)

Für die Herstellung von LASV GP VLPs wurden stabil transfizierte MDCK II-Zellen verwendet, die von K. Schlie aus dem Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg generiert und bereits beschrieben wurden (Schlie et al., 2010a). Diese Zellen exprimieren kontinuierlich LASV GP und sezernieren es in Form von VLPs in den Zellkulturüberstand. Für die Generierung von großen Mengen an VLPs wurden MDCK II LASV GP-Zellen in 175 cm² Zellkulturflaschen ausgesät und bei 37°C für 4 Tage kultiviert. Anschließend wurde das Zellkulturmedium durch MEM, das 2% FKS, 2 mM L-Glutamin, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin enthält, ersetzt und die Zellen für weitere 4 Tage kultiviert. Die Zellkulturüberstände wurden geerntet, und um Zelltrümmer zu entfernen, zweimal niedertourig bei $3.345 \times g$ für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Danach wurde der zentrifugierte Überstand in Zentrifugenröhrchen für *SW 32 Ti Swinging-Bucket Rotor* vorgelegt, vorsichtig mit 3 ml 20%iger Saccharoselösung in PBS^{def} unterschichtet und für 1,5 h bei $110.000 \times g$ und 4°C ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das Pellet in PBS^{def} resuspendiert. Die aufgereinigten VLPs wurden bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert. Nach jeder Aufreinigung wurde die LASV GP Expression im Zelllysat und die LASV GP VLPs aus dem aufgereinigten Überstand mittels SDS-PAGE und Western Blot (siehe 4.2.2 und 4.2.4) untersucht und die Proteinkonzentration mit dem *Pierce BCA Protein Assay Kit* von der Firma Thermo Fisher Scientific nach Herstellerangaben bestimmt.

Die aufgereinigten VLPs wurden verwendet, um LASV GP-spezifische Antikörper in Kaninchen zu generieren. Alle Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit den Bestimmungen der deutschen Tierschutzgesetze durchgeführt und vom Regierungspräsidium Darmstadt genehmigt. Die beiden neuseeländischen weißen Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) wurden von Charles River in Deutschland kommerziell erworben und intramuskulär mit 300 µg LASV GP VLPs immunisiert.

4.4 Arbeitsmethoden mit humanen primären bronchialen Epithelzellen

4.4.1 Auftauen und Inkulturnahme

Die primären humanen bronchialen Epithelzellen (HBEpC) wurden als Aliquots mit ca. 1 Mio. Zellen in 1,5 ml Einfriermedium bei -196°C in der Gasphase oberhalb von flüssigem Stickstoff gelagert. Die Zellen wurden von zwei unterschiedlichen Herstellern kommerziell erworben und unterschiedlich kultiviert. Die Zellen der Firma Provitro wurden nach dem Auftauen in 4 ml AECG-Medium aufgenommen und anschließend bei 1.200 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 2 ml AECG-Medium aufgenommen. Anschließend wurde die Zellsuspension in eine 75 cm² Zellkulturflasche mit 25 ml bereits vorgelegtem AECG-Medium gegeben. Das Medium wurde nach 24 h und danach alle 48 h gewechselt.

Die Zellen der Firma Lonza wurden nach dem Auftauen direkt in eine 75 cm² Zellkulturflasche gegeben, in der bereits 25 ml BEGM Medium vorgelegt wurde. Das Medium wurde nach 24 h und danach alle 48 h gewechselt, bis die Zellen eine Konfluenz von 70-80% aufwiesen.

Die Kultivierung von primären Zellen ist sehr anspruchsvoll und gelingt bei Zellen mit einer geringen Anzahl an bisherigen Passagen besonders gut. Daher wurden die Versuche so konzipiert, dass alle Zellen verbraucht wurden und keine Zellen erneut eingefroren und gelagert wurden. Für jeden Versuchsansatz wurde daher ein Originalröhrchen aufgetaut.

4.4.2 Passagieren und Aussäen

Die Zellen von Provitro wurden zunächst mit 10 ml PBS^{def} gewaschen und anschließend für 4 min mit 5 ml Trypsin-EDTA im Brutschrank inkubiert. Zum Abstoppen der Trypsinierungsreaktion wurden 10 ml inaktiviertes FKS dazu gegeben und die Zellen gut resuspendiert. Die Zellsuspension wurde bei 1.200 rpm für 10 min zentrifugiert und der Überstand anschließend vorsichtig abgesaugt. Nachdem das Zellpellet in 5 ml AECG-Medium resuspendiert wurde, wurden 10 µl der Zellsuspension in eine Neubauer Zählkammer gegeben und die Zellzahl/ml bestimmt. Dazu wurden die Zellen in den 4 Eckquadraten gezählt und anschließend das arithmetische Mittel bestimmt. Der Mittelwert wurde mit den Faktoren 10 und 1.000 multipliziert, um die Zellzahl/ml zu berechnen. Für die Versuche mit unpolaren HBEpC wurden 125.000 Zellen pro Vertiefung in eine Zellkulturplatte mit 12 Vertiefungen ausgesät, bzw. 28.000 Zellen pro Deckglas in eine Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen. Für die Differenzierung der HBEpC im Transwell-Filter System wurden 150.000 Zellen pro Filter ausgesät.

Zum Passagieren der Zellen von der Firma Lonza wurde das *ReagentPack* (Lonza) verwendet. Die Zellen wurden zunächst mit 5 ml HEPES-Puffer gewaschen und anschließend für maximal 3 min mit 5 ml Trypsin inkubiert. Dabei wurde im Lichtmikroskop das Abrunden und Ablösen der Zellen kontrolliert. Zum Abstoppen der Trypsinierungsreaktion wurden 12 ml Trypsin-Neutralisation-Lösung dazu gegeben und die Zellen gut resuspendiert. Die Zellsuspension wurde bei 1.600 rpm für 10 min zentrifugiert und der Überstand anschließend abgesaugt. Nachdem das Zellpellet in 5 ml AECG-Medium resuspendiert wurde, wurden 10 µl der Zellsuspension in eine Neubauer Zählkammer gegeben und die Zellzahl/ml wie oben bereits beschrieben bestimmt. Für die Differenzierung auf den Transwell-Filtern wurden 75.000 Zellen pro Filter ausgesät.

4.4.3 Kollagenbeschichtung von Transwell-Filtern

Epithelzellen bilden ein Gewebe, indem sie über Zell-Zell-Kontakte mit den Nachbarzellen verbunden sind und auf einer Basalmembran haften. Diese besteht aus zahlreichen Proteinen und stellt eine Barriere zur Submukosa dar. Um möglichst physiologische Kulturbedingungen zu schaffen, wurden die Transwell-Filter mit Kollagen Typ I beschichtet (Pohl et al., 2009). Für die Herstellung einer Kollagen-Stammlösung wurde zuerst eine 0,1%ige Lösung in 0,1 M Essigsäure (steril filtriert) angesetzt und für

2 h bei RT in Lösung gebracht. Als Gebrauchslösung wurde eine 0,01%ige Kollagen-Lösung verwendet, bei der die Stammlösung 1:10 in dH₂O verdünnt wurde. Auf die Transwell-Filter wurden jeweils 500 µl der Gebrauchslösung gegeben und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Die überschüssige Flüssigkeit auf den Transwell-Filtern wurde am folgenden Tag abgesaugt und die Zellkulturplatten wurden mit offenem Deckel für 2 h unter UV-Licht in einer sterilen Werkbank inaktiviert, um eine mögliche Besiedelung mit Keimen zu verhindern. Anschließend wurden die Zellkulturplatten mit den Transwell-Filtern in sterile Autoklavierbeutel verpackt und luftdicht verschlossen. Die Filter wurden bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert. Vor dem Aussäen der Zellen wurden die mit Kollagen beschichteten Filter aus den sterilen Autoklavierbeuteln entnommen und apikal wurde 250 µl, in die basale Vertiefung 1 ml des Zellkulturmediums gegeben. Anschließend wurden die Filter für 30 min im Brutschrank inkubiert, um ein Aufquellen der Kollagenbeschichtung zu bewirken.

4.4.4 Kultivierung auf Transwell-Filtern

Zur Generierung eines polaren und differenzierten Epithels aus HBEPcs, das dem respiratorischen Epithel entsprechen soll, wurde das Transwell-Filter System der Firma CORNING verwendet und die Zellen unter ALI-Bedingungen kultiviert. Hierbei wurden die Zellen zunächst mit Zellkulturmedium bis zum Erreichen einer hohen Konfluenz kultiviert. Danach wurde das Medium im apikalen Bereich entfernt und die Zellen nur noch über das Medium in der basolateralen Vertiefung versorgt, was den physiologischen Bedingungen von Atemwegsepithelzellen entspricht. Nach dem Aussäen wurden die HBEPcs von der Firma Provitro nach den Angaben eines bereits publizierten Protokolls kultiviert (Bals et al., 2004). Dazu wurde das apikale Medium zunächst nach 24 h durch frisches Medium ersetzt und nach 48 h wurde das apikale Medium entfernt und das basale Medium durch 1 ml ALI-Zellkulturmedium ersetzt. Dieses Medium besteht aus dem AECG-Medium, das zu gleichen Teilen mit DMEM gemischt wird und neben 50 U/ml Penicillin/Streptomycin zusätzlich 50 ng/ml Retinolsäure enthält. Die nächsten 7 Tage wurde zweimal täglich der apikale Überstand abgesaugt. Die Zellen von der Firma Lonza wurden den Herstellerangaben entsprechend ebenfalls auf den Transwell-Filtern bis zur Differenzierung kultiviert. Die entsprechende Zellzahl wurde in 500 µl Zellkulturmedium auf jeden Filter ausgesät und das apikale Medium nach 24 h gewechselt, um nicht adhärierte Zellen zu entfernen. Im Anschluss wurde das apikale und basale Medium alle 48 h ersetzt. Sobald sich auf den Filtern nach 3-4 Tagen ein konfluenter einschichtiger Zellrasen aus nicht-differenzierten Epithelzellen ausgebildet hatte, wurde das apikale Medium entfernt und das basale Medium durch 1 ml ALI-Zellkulturmedium ersetzt. Dieses Medium besteht aus dem BEGM-Medium, das zu gleichen Teilen mit DMEM gemischt wird und neben 50 U/ml Penicillin/Streptomycin zusätzlich 50 ng/ml Retinolsäure enthält. Die Zellen beider Hersteller wurden jeweils unter ähnlichen Zellkulturbedingungen kultiviert. Das ALI-Medium wurde hierbei für jeden Zellkulturmediumwechsel neu angesetzt. Die Kultivierung auf den Transwell-Filtern erfolgte bei 37°C und 5% CO₂. Nach 4-5 Wochen entwickelten die HBEPcs einen differenzierten

Phänotyp, der durch einen charakteristischen transepithelialen elektrischen Widerstand, mikroskopisch nachweisbaren Zilien, sowie der Produktion von Mukus auf der Epitheloberfläche nachweisbar war.

4.4.5 Bestimmung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER)

Epithelzellen sind in der Lage einen polaren Phänotyp auszubilden. Durch die Ausbildung von *tight junctions*, speziellen Zell-Zell-Verbindungen im apikalen Bereich der Zelle, wird der parazelluläre Bereich zur Oberfläche hin abgedichtet. Da kein freier Ionenfluss mehr möglich ist, entsteht ein messbarer Widerstand. Die Höhe des TEER Wertes korreliert dabei mit der Ausbildung eines mehrreihigen und somit polaren Epithels. Die Messung der Widerstände erfolgte jeden zweiten Tag nach dem Mediumwechsel und wurde mit dem Volt-Ohm-Meter-Messgerät *EVOM2* durchgeführt. Die beiden Messelektroden wurden vor jeder Messung in 70%igem Ethanol gereinigt, an der Luft getrocknet und für 20 min in ALI-Medium äquilibriert. Für die Messung wurden 500 µl ALI-Medium auf den Filter gegeben und nach der Messung direkt wieder abgenommen. Während der Messung wurden die beiden Elektroden so gehalten, dass die längere Elektrode in die Vertiefung (basolaterales Kompartiment) und die kürzere Elektrode in den Zellkultureinsatz (apikales Kompartiment) hineinragt. Durch die gelösten Salze im Zellkulturmedium ist dieses elektrisch leitfähig und ermöglicht einen Stromfluss zwischen dem apikalen und dem basolateralen Kompartiment. Da der Transwell-Filter allein bereits einen geringen elektrischen Widerstand aufweist und es zu leichten tagesabhängigen Messschwankungen kommt, wurde bei jeder Messreihe der Leerfilter gemessen und von den Messwerten abgezogen. Die Differenz wurde mit der Wachstumsfläche multipliziert und die TEER Werte in $\Omega \cdot \text{cm}^2$ angegeben. Sobald ein TEER von $> 800 \Omega \cdot \text{cm}^2$ erreicht war, konnten die Zellen für Versuche verwendet werden.

4.4.6 Gewinnung und Anreicherung von Muzinen

Das respiratorische Epithel besteht aus zahlreichen Mukus-produzierenden Zellen, die die Muzine auf die Epitheloberfläche sezernieren und so eine zusätzliche Barriere für Pathogene schaffen. Die HBEpCs wurden dahingehend untersucht, ab welchem Zeitpunkt der Differenzierung die Muzinsekretion einsetzt und ob diese Muzine einen potenziellen inhibitorischen Effekt auf eine Infektion mit VSVΔG/LASV GP haben. Dafür wurden wöchentlich 500 µl warmes PBS^{def} apikal auf die Zellen gegeben, für 5 min inkubiert und anschließend auf dem Filter mehrmals auf und ab pipettiert. Die erhaltenen Sekrete wurden in einem kleinen Falcon gesammelt und durch Zentrifugation bei $4.000 \times g$ für 30 min konzentriert. Der Überstand wurde bis auf 1 ml vorsichtig entfernt und das restliche Volumen erneut bei $15.700 \times g$ für 30 min zentrifugiert und somit weiter angereichert. Der Überstand wurde bis auf 200 µL entfernt und mit 4× PP für die Western Blot-Analyse versetzt oder direkt bei -20°C bis zu den Infektionsstudien gelagert.

4.4.7 Histologische Aufbereitung

Dieses Verfahren ist eine gängige Methode in der Histologie und Pathologie und dient der Präparation von Gewebeproben und deren anschließender lichtmikroskopischer Auswertung. Man erzielt eine gute Darstellung der morphologischen Merkmale, wie z.B. der Schichtung der Epithelzellen, deren Lage im Zellverband, sowie der Zellform. Die Zellen auf den Transwell-Filtern wurden für 20 min bei RT mit 4% PFA fixiert und in 70%igem Ethanol für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran in 3 - 5 mm breite Streifen geschnitten und in eine Einbettungskassette überführt. Die weiteren Schritte wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie am Universitätsklinikum Marburg durchgeführt. Dort wurden die Filter an einer Paraffin-Ausgießstation in Paraffin eingebettet und nach dem Aushärten an einem Mikrotom in 1 – 5 µm dicke Schnitte geschnitten. Die Schnitte wurden auf Objektträger gezogen und für 30 min bei 40°C in einem Objektträger-Schnelltrockner überschmolzen. Anschließend wurden die Präparate im Färbeautomaten weiter behandelt. Für die Färbung des Präparates im wässrigen Milieu musste das Paraffin wieder entfernt werden. Dazu wurde es zuerst in Xylol entparaffiniert und anschließend über eine absteigende Ethanolreihe (100%-, 96%- und 70%igem Ethanol) wieder ins wässrige Milieu überführt. Die Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin und Eosin wurde zur Darstellung der morphologischen Merkmale angewendet. Die basophilen Bestandteile, wie der Zellkern und das raue endoplasmatische Retikulum werden vom Hämatoxylin blau angefärbt und die acidophilen Zellbestandteile wie Plasmaproteine und das glatte endoplasmatische Retikulum vom Eosin rot. Vor dem Eindecken mit Eindeckmittel wurde das Präparat erneut in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert und anschließend in das Intermedium Xylol überführt. Die Auswertung erfolgte am Lichtmikroskop *DMi1* der Firma Leica.

4.5 Virologische Methoden

4.5.1 Herstellung einer LASV-Stammsuspension

Zur Herstellung einer LASV-Stammsuspension wurden Vero E6-Zellen in einer 75 cm² Zellkulturflasche bis zu einer Konfluenz von 70% kultiviert. Das Zellkulturmedium wurde abgenommen und die Zellen wurden mit PBS^{def} gespült, um Rückstände vom Medium zu entfernen, die bei der Infektion stören könnten. Eine bereits vorhandene Stammsuspension von LASV Josiah wurde 1:100 in 5 ml DMEM ohne FKS verdünnt und auf die Zellen gegeben. Nach 1 h Inkubation bei 37°C wurde das Inokulum entfernt und durch 25 ml DMEM mit 2% FKS ersetzt. Die Zellen wurden nach der Infektion solange inkubiert, bis ein zytopathischer Effekt (engl. *cytopathogenic effect*, CPE) lichtmikroskopisch erkennbar war. Zur Beurteilung des CPEs wurde eine 75 cm² Zellkulturflasche mit Vero E6-Zellen als Mock für 1 h mit DMEM ohne FKS inkubiert und danach ebenfalls in DMEM mit 2% FKS kultiviert. Die mit LASV infizierten Zellen bildeten nach 6-7 Tagen einen CPE aus. Für die Virusernte wurde der Zellkulturüberstand in ein großes Falcon überführt und für 10 min bei 4.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und jeweils 250 µl wurden in ein Einfrierröhrchen überführt. Die Aliquots

wurden bei -80°C oder bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert und der Virustiter mittels Endpunkttitration (TCID₅₀, von *Tissue culture infectious dose* 50) (4.5.6.2) bestimmt.

4.5.2 Herstellung einer VSV- und VSVΔG/LASVGP-Stammsuspension

Für die Herstellung von VSV- und VSVΔG/LASVGP-Stammsuspensionen wurden Vero E6-Zellen in einer 75 cm² Zellkulturflasche bis zu einer Konfluenz von 100% kultiviert und mit wildtypischen VSV bzw. VSVΔG/LASVGP infiziert. Um störende Rückstände aus dem Zellkulturmedium zu entfernen, wurden die Zellen vor der Infektion mit PBS^{def} gespült. Die Viren wurden 1:1.000 in 5 ml DMEM ohne FKS verdünnt und auf die Zellen gegeben. Nach der Inkubation für 1 h bei 37°C im Brutschrank wurde das Inokulum entfernt und durch 25 ml DMEM mit 2% FKS ersetzt. Die Zellen wurden nach der Infektion solange inkubiert, bis sich ein deutlicher CPE ausgebildet hatte. Zum Vergleich wurden Vero E6-Zellen als Mock behandelt und dazu für 1 h mit DMEM ohne FKS inkubiert und danach ebenfalls in DMEM mit 2% FKS kultiviert. Die mit VSV-infizierten Zellen bildeten nach 24 h einen CPE aus, wohingegen die mit VSVΔG/LASVGP-infizierten Zellen einen ausgeprägten CPE nach 48 h zeigten. Für die Virusernte wurde der Zellkulturüberstand für 10 min bei 4.000 rpm zentrifugiert, je 250 µl des Überstandes in ein Gefrieröhrchen aliquotiert und bei -80°C gelagert. Der Virustiter wurde mittels Plaque-Assay (4.5.6.1) bestimmt.

4.5.3 Anreicherung von LASV-Partikeln

Für die vergleichende Untersuchung des Glykosylierungsprofils von LASV GP wurde LASV in verschiedenen Zellen kultiviert und nach der Virusernte durch Ultrazentrifugation angereichert. Dafür wurden MDCK II-Zellen, BHK-Zellen und HuH7-Zellen jeweils in eine 75 cm² Zellkulturflasche ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 70% kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit einer MOI (engl. *multiplicity of infection* für Infektionsdosis; Partikelzahl pro Zelle) von 0,1 mit LASV Josiah infiziert und nach der Abnahme des Inokulums für 5 Tage bei 37°C inkubiert. Die Zellkulturüberstände wurden zunächst durch niedertourige Zentrifugation bei 3.345 × g für 10 min bei 4°C von Zelltrümmern befreit. Anschließend wurden jeweils 30 ml des zentrifugierten Überstandes in Zentrifugenöhrchen für einen SW 32 *Ti Swinging-Bucket Rotor* vorgelegt und vorsichtig mit 3 ml 20%iger Saccharoselösung in PBS^{def} unterschichtet. Danach wurden 7 ml des Überstandes vorsichtig von oben dazugegeben und die Röhrchen gegeneinander austariert. Die Ultrazentrifugation erfolgte für 1,5 h bei 110.000 × g und 4°C. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig dekantiert, das Pellet in PBS^{def} resuspendiert und 4x PP dazugegeben.

4.5.4 Infektionsstudien in unpolaren Zellen

4.5.4.1 LASV-Infektion in HBEPcs

Mit diesem Versuch sollte untersucht werden, ob eine Infektion mit LASV zu einer IFN-Induktion in HBEPcs führt. Dafür wurden HBEPcs in Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen ausgesät und bis zu einer

Konfluenz von 90% kultiviert. Nachdem das Medium abgenommen worden war, wurden die Zellen mit PBS^{def} gespült und anschließend mit $2,4 \times 10^4$ PFU LASV Josiah in 400 µl AECG-Medium infiziert. Für die Berechnung der MOI wurde der TCID₅₀/ml-Virustiter mit dem Faktor 0,7 multipliziert und so in PFU/ml umgerechnet. Die Zellen wurden für 1 h bei 37°C inkubiert, erneut mit PBS^{def} gespült und das Inokulum durch frisches AECG Medium ersetzt. Für die Mock-Kontrolle wurden 400 µl des AECG-Mediums auf die Zellen gegeben. Für die Erstellung einer Wachstumskinetik wurden die Überstände und die Zelllysate in den zeitlichen Abständen 0, 1 und 2 Tage nach Infektion (dpi, *days post infection*) entnommen. Dazu wurde der virushaltige Überstand für 5 min bei 8.000 rpm zentrifugiert, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für die spätere Bestimmung des Virustiters mittels TCID₅₀ bei -80°C gelagert (siehe 4.5.6.2). Die Zelllysate wurden geerntet und die RNA wie bereits in 4.1.1 beschrieben, isoliert.

4.5.4.2 Mukusinhibitionstest

Dieser Versuch dient dem Nachweis von virusinhibierenden Bestandteilen im humanen Atemwegsmucus. Dafür wurden am Vortag Vero E6-Zellen in eine Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 100% kultiviert. Der konzentrierte Mukus aus dem apikalen Zellkulturüberstand (siehe 4.4.6) wurde seriell im Infektionsmedium (0,1% BSA, 1% P/S, 1% Glutamin in DMEM) verdünnt (von unverdünnt bis zu einer 1:8.192 Verdünnung) und zu jeder Verdünnung wurden entweder 800 PFU VSVΔG/LASVGP oder, als Positivkontrolle 1.400 infektiöse Einheiten (IU) des Pandemievirus rH1N1/2009 dazugegeben und für 1 h bei 37°C vorinkubiert. Jeder Ansatz aus Virus-Mucus-Gemisch wurde im Triplikat bestimmt und für 8 h bei 37°C inkubiert, sodass ein Replikationszyklus erfolgreich abgeschlossen werden konnte. Anschließend wurden die Zellen über Nacht mit 100 µl 4% PFA pro Vertiefung fixiert und anschließend mit 100 µl Permeabilitätspuffer pro Vertiefung für 15 min inkubiert. Die primären Antikörper wurden 1:500 und die sekundären Antikörper 1:2.000 in Blockierungspuffer verdünnt und für 1 h bei RT inkubiert. Für die Färbung der infizierten Zellen wurde 50 µl TrueBlue pro Vertiefung dazugegeben und für ca. 30 min inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch das Spülen der Zellen mit entionisiertem Wasser beendet. Für den Nachweis von VSVΔG/LASVGP wurde ein polyklonales Kaninchen anti-VSV Serum verwendet und für den Nachweis von H1N1 ein monoklonaler Maus anti-NP Antikörper. Als Sekundärantikörper wurden HRP-gekoppelte anti-Kaninchen, bzw. anti-Maus Antikörper verwendet. Die infizierten Zellen wurden an dem Lichtmikroskop DMi1 gezählt und aus den Triplikaten wurden die Mittelwerte berechnet. Die Viruskontrolle ohne Mukuszugabe wurde auf 100% gesetzt und für die Neutralisationstiter wurden die infizierten Zellen relativ zu der jeweiligen Kontrolle dargestellt.

4.5.4.3 CPE-basierter Virusneutralisationstest mit VSVΔG/LASVGP

Für die Untersuchung und Quantifizierung von LASV GP-spezifischen neutralisierenden Antikörpern wurde das replikationsfähige VSVΔG/LASVGP als Surrogatsystem verwendet. Dafür wurden am Vortag Vero E6-, A549- oder 16HBE14o-Zellen in eine Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 100% kultiviert. Für die Bestimmung der Virusneutralisationstiter aus Kaninchenseren wurde ein polyklonales Kaninchenserum gegen VSV als Positivkontrolle mitgeführt. Bei der Untersuchung der humanen Seren wurde der LASV GP-spezifische humane monoklonale Antikörper 37.7H als Positivkontrolle verwendet. Alle untersuchten Seren wurden zunächst für 30 min bei 56°C erhitzt, um das Komplement zu inaktivieren. Anschließend wurden sie für 10 min bei 8.000 rpm zentrifugiert und der Überstand für die Bestimmung des Neutralisationstiter verwendet. Die Seren wurden seriell 1:2 verdünnt und mit 25 PFU VSVΔG/LASVGP pro Vertiefung für 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Zellkulturmedium von den Zellen abgenommen und die Virus-Antikörper/Serum-Mischung dazugegeben. Der CPE wurde 2 Tage nach der Infektion lichtmikroskopisch beurteilt. Im Falle einer Neutralisation durch spezifische Antikörper lässt sich eine Verringerung des CPE im Vergleich zu der Viruskontrolle (virusinfizierte Zellen ohne Vorinkubation mit einem Serum) beobachten. Die Neutralisationstiter stellen den reziproken Wert der letzten Verdünnung dar, bei der noch eine Neutralisation beobachtet werden konnte und wurden als geometrische Mittelwerte (GMT) von vier Replikaten berechnet.

4.5.4.4 Durchflusszytometrie-basierter Virusneutralisationstest mit VSVΔG/LASVGP

Dieses Nachweisverfahren wurde etabliert, um die Neutralisationstiter von aufgereinigten LASV GP-spezifischen Antikörpern aus Kaninchenseren in den Zelllinien Vero E6, HuH7 und THP-1 vergleichen zu können. Dafür wurden zunächst 4×10^5 Vero E6- oder HuH7-Zellen pro Vertiefung in eine Zellkulturplatte mit 6 Vertiefungen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 70% kultiviert. Die THP-1-Zellen wurden zunächst durch die Stimulation mit Phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA) differenziert. Dafür wurden 4×10^5 Zellen pro Vertiefung in eine Zellkulturplatte mit 6 Vertiefungen ausgesät und mit 200 nM PMA differenziert (Daigneault et al., 2010). Nach 2 Tagen wurde das PMA entfernt, frisches Zellkulturmedium dazugegeben und die Zellen für 5 weitere Tage kultiviert. Die IgG-Präparationen Rb#347_D77+ und Rb#350_D77+ wurden seriell in den entsprechenden Zellkulturmedium von 1:250 bis 1:1.000 verdünnt und für 1 h bei 37°C mit einer MOI von 0,1 mit VSVΔG/LASVGP inkubiert. Anschließend wurde das Virus-Antikörper-Gemisch auf die Zellen gegeben und für 22 h inkubiert. VSVΔG/LASVGP-infizierte Zellen ohne IgG-Vorinkubation wurden als Viruskontrolle verwendet und nicht-infizierte Zellen, die nur mit den Antikörpern inkubiert wurden, als Serumkontrolle. Die Zellen wurden schonend durch Trypsinierung geerntet, mit 4% PFA für 20 min bei RT fixiert und mit FACS-Puffer für 30 min bei RT permeabilisiert. Virusinfizierte Zellen wurden spezifisch mit einem polyklonalen anti-VSV Serum aus dem Meerschweinchen und einem FITC-gekoppelten anti-

Meerschweinchen Antikörper gefärbt. Beide Antikörper wurden 1:1.000 verdünnt und jeweils für 1 h bei 4°C inkubiert. Nach jedem Inkubationsschritt wurden die Zellen 2x mit FACS-Puffer gewaschen und die virusinfizierten Zellen an dem Durchflusszytometer *BD FACSCalibur* analysiert und quantifiziert. Die Datensätze wurden anschließend mit dem Softwarepaket *FlowJo v10.0* ausgewertet. Die Analyse und Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Jens Dorna aus dem Institut für Immunologie der Philipps-Universität Marburg.

4.5.4.5 Neutralisations-Bindungs-Assay

Um zu untersuchen, ob eine Neutralisation durch die LASV GP-spezifischen Antiseren Rb#347_D77 und Rb#350_D77 vor oder nach der Virusbindung an den zellulären Rezeptor erfolgt, wurden zwei verschiedene Virusneutralisationstests mit VSVΔG/LASVGP durchgeführt. Für beide Varianten wurden Vero E6-Zellen zunächst am Vortag in eine Zellkulturplatte mit 12 Vertiefungen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 100% kultiviert. Für die Untersuchung einer Neutralisation vor der Virusbindung wurden die Kaninchenserumserien seriell von 2^6 bis 2^{11} verdünnt, zu jeder Serumverdünnung wurden 300 PFU VSVΔG/LASVGP gegeben und die Mischung anschließend für 1 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch auf die Vero E6-Zellen gegeben und erst für 1 h bei 4°C inkubiert und danach für 30 min bei 37°C. Das Inokulum wurde entfernt und durch DMEM mit 2% FKS ersetzt. Für die Untersuchung einer Neutralisation nach der Virusbindung wurden 300 PFU VSVΔG/LASVGP zu den Vero E6-Zellen gegeben und für 1 h bei 4°C inkubiert. Die Kaninchenserumserien wurden wie bereits für den oberen Ansatz seriell verdünnt, zu der Viruslösung auf den Zellen gegeben und erst für 1 h bei 4°C inkubiert und danach für 30 min bei 37°C. Das Inokulum wurde entfernt und durch DMEM mit 2% FKS ersetzt. Nach 24 h wurden die Zelllysate geerntet und zum Nachweis viraler Proteine wurden die Proben mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht.

4.5.5 Infektionsstudien in differenzierten HBEpCs

4.5.5.1 Infektionsstudien mit LASV

Für Infektionsstudien in einem ausdifferenzierten respiratorischen Epithel wurden HBEpCs auf Transwell-Filter ausgesät und für 30 Tage unter ALI-Bedingungen kultiviert. Die Zellen wurden dann je nach Fragestellung mit einer entsprechenden MOI entweder von der apikalen oder basolateralen Seite mit LASV infiziert oder simultan von beiden Seiten. Für die Berechnung der MOI wurde der TCID₅₀/ml-Virustiter mit dem Faktor 0,7 multipliziert und so in PFU/ml umgerechnet. Um den Mukus auf den Zellen zu entfernen und somit einen Viruseintritt über die apikale Membran zu ermöglichen, wurden die Zellen apikal dreimal mit warmen PBS^{def} für jeweils 5 min gespült. Für die Wachstumskinetik (MOI 0,5) und Immunfluoreszenzanalysen (MOI 0,1) wurden die Zellen mit 200 µl Inokulum entweder von der apikalen Seite oder der basolateralen Seite infiziert. Nach der Virusadsorption bei 37°C für 1 h wurde das Inokulum entfernt und die Zellen dreimal für je 10 min mit PBS^{def} gewaschen. Nach Zugabe

des ALI-Mediums wurden die Zellen unter ALI-Bedingungen weiter kultiviert. Für die apikale Virusernte wurden 500 µl ALI Medium auf den Filter gegeben, für 30 min inkubiert und der Überstand anschließend für 5 min bei 8.000 rpm zentrifugiert, um zelluläre Bestandteile zu entfernen. Für die basolaterale Virusernte wurde das Zellkulturmedium aus der Vertiefung entnommen und ebenfalls für 5 min bei 8.000 rpm zentrifugiert. Die Virustiter wurden mittels TCID₅₀ auf Vero E6-Zellen bestimmt (siehe 4.5.6.2).

4.5.5.2 Infektionsstudien zum Wirtszelltropismus

Zur Bestimmung der initialen Zielzellen von LASV im humanen Respirationstrakt wurden die HBEPs mit dem replikationsfähigen Surrogat-Virus VSVΔG/LASVGP infiziert und nach Beendigung eines einmaligen Replikationszyklus fixiert und gegen virale und zelluläre Proteine gefärbt. Als Kontrolle für das Testsystem wurden die HBEPs apikal mit dem aviären Influenza A Virus (IAV) H3N2-R2 infiziert (Matrosovich et al., 2004). Darüber hinaus wurden die Zellen als Kontrolle mit wildtypischem VSV infiziert, um den LASV GP-spezifischen Wirtszelltropismus aufzuzeigen. Um akkumulierte und störende Muzine zu entfernen und so einen Viruseintritt über die apikale Membran zu ermöglichen wurden die Zellen apikal 3x mit warmen PBS^{def} für jeweils 5 min gespült. Die Zellen wurden apikal mit 2.6×10^5 PFU IAV infiziert, bzw. simultan apikal und basolateral mit 1.2×10^5 PFU VSV, oder entweder apikal oder basolateral mit 2.2×10^6 PFU VSVΔ/LASVGP. Nach 1 h Inkubation mit dem entsprechenden Inokulum wurden die Zellen 3x apikal und basolateral mit PBS^{def} gespült. Basolateral wurde frisches ALI-Medium dazugegeben und die Zellen für 8 h, bzw. 12 h oder 14 h inkubiert. Für die Immunfluoreszenzanalyse wurden die Zellen wie in 4.2.7 beschrieben weiter behandelt.

4.5.6 Virustiterbestimmung

4.5.6.1 Plaque-Test

Mit Hilfe des Plaque-Tests können replikationsfähige Viren quantifiziert werden. Diese Methode eignet sich jedoch nur bei Viren, die einen sehr starken CPE ausbilden und wurde daher für die Virustiterbestimmung von wildtypischen VSV und VSVΔG/LASVGP verwendet. Dafür wurden am Vortag Vero E6-Zellen in eine Zellkulturplatte mit 12 Vertiefungen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 100% kultiviert. Die Virusstammsuspensionen wurden in einer geometrischen Verdünnungsreihe von 10^{-1} bis 10^{-12} in DMEM ohne FKS verdünnt. Um Rückstände vom Medium zu entfernen, wurden die Zellen mit PBS++ gewaschen. Für die Infektion wurden 400 µl der entsprechenden Virusverdünnung auf die Zellen gegeben und für 1 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Abnahme des Inokulums wurden die Zellen erneut mit PBS++ gespült und mit 800 µl einer 1,2%igen Avicelllösung in 2x MEM mit 4% FKS überschichtet. Durch die zähflüssige Konsistenz des Überschichtungsmediums sind die Viren in der Lage nur noch die direkten Nachbarzellen zu infizieren, sodass jeder entstandene Plaque ursprünglich von nur einem Virus verursacht wird. Nach 24 h (VSV) bzw. 72 h (VSVΔG/LASVGP) wurden

die Zellen mit 400 µl 1%iger Kristallviolettlösung in 10% Formalin für 30 min bei RT fixiert. Danach wurden die Zellen 2x mit PBS^{def} gewaschen. Für die Auswertung wurden die Plaques in den Vertiefungen gezählt und mit dem Kehrwert der Verdünnung und dem Faktor 1,5 multipliziert. Der Virustiter wurde in PFU/ml (*plaque forming units/ml*) angegeben.

4.5.6.2 Endpunkttitration (TCID₅₀)

Mit dieser Methode wurden die LASV Titer aus den entsprechenden Versuchsansätzen bestimmt. Dabei wird in einem vierfachen Ansatz die letzte Verdünnungsstufe einer Virussuspension ermittelt, bei der noch bei 50% der Zellen eine Infektion des Zellrasens beobachtet werden kann. Dafür wurden Vero E6 Zellen in eine Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen zu einer Konfluenz von 70% ausgesät. Um mit einer Virusverdünnung von 10^{-1} zu beginnen, wurde in die erste Vertiefung 20 µl der Virussuspension zu 180 µl Medium gegeben, gut vermischt und jeweils 20 µl in die nächste Vertiefung pipettiert. So wurde eine serielle Verdünnungsreihe der Virussuspension mit den Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-8} erstellt. Nach 7-10 Tagen wurden die Zellen lichtmikroskopisch auf die Ausbildung eines CPE hin untersucht und der Virustiter als TCID₅₀/ml mit der Formel nach Reed und Muench (Reed and Muench, 1938) berechnet.

5 Ergebnisse

5.1 LASV-Infektion in humanen Atemwegsepithelzellen

Um den Mechanismus des LASV-Eintritts über den humanen Respirationstrakt zu untersuchen, wurde ein *in vitro*-Zellkulturmodell aus primären humanen Bronchialepithelzellen (HBEPs) etabliert. Das häufigste Zellkulturmodell zur Darstellung der humanen Atemwege ist hierbei das so genannte ALI (*air liquid interface*)-Zellkulturmodell, bei dem die Epithelzellen in einem Transwell-Filter-System kultiviert und dabei nur über die basolaterale Membranseite mit Zellkulturmedium versorgt werden (Abb. 5.1) (Wu et al., 1986). Diese ALI-Zellkulturen sind dem menschlichen Atemwegsepithel *in vivo* in Hinblick auf ihre Zell-Zusammensetzung, Struktur und ihre funktionellen Eigenschaften sehr ähnlich (Farsani et al., 2015; Kesimer et al., 2009; Upadhyay und Palmberg, 2018). In Transkriptom-Studien konnte gezeigt werden, dass die differenziell regulierte Gensignatur mit den Genen eines proliferativen, mehrreihigen und Zilien-tragenden Epithels korreliert (Ross et al., 2007), wenn auch mit leichten Unterschieden in der Anzahl bestimmter Zelltypen (Dvorak et al., 2011). In dieser Arbeit wurden differenzierte HBEPs als *in vitro* Zellkulturmodell für die Untersuchung einer LASV-Infektion der humanen Atemwege verwendet, um die Replikationskinetik, den Viruseintritt und die Virusfreisetzung, den Wirtszelltropismus sowie die Induktion einer Immunantwort zu untersuchen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen die Bedeutung der menschlichen Atemwege als LASV-Eintrittspforte und ihre mögliche Rolle bei der Mensch-zu-Mensch Übertragung über Aerosole auf.

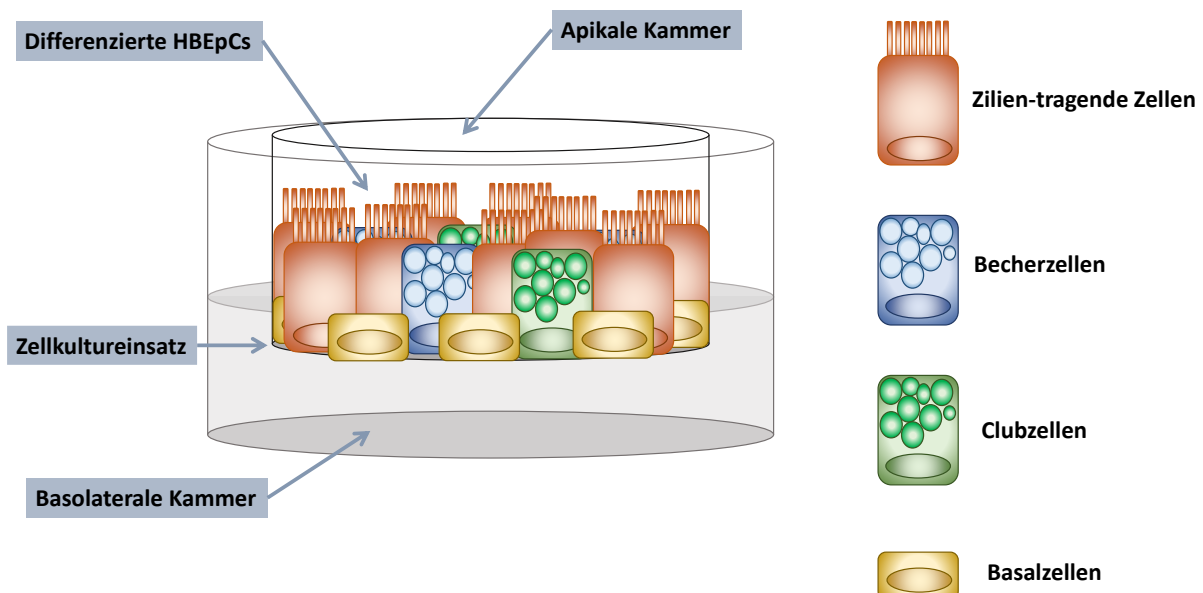


Abb. 5.1: Schematische Darstellung des Transwell-Filter Systems mit respiratorischen Epithelzellen als ALI-Zellkultur. HBEPs werden auf Transwell-Filtern kultiviert und nach 3 Tagen nur noch über die basolaterale Membran mit Zellkulturmedium versorgt. Nach ca. 28 Tagen kommt es zur Ausbildung eines differenzierten respiratorischen Epithels, bestehend aus Zilien-tragenden Zellen, sekretorischen Becherzellen und Clubzellen sowie Basalzellen.

5.1.1 Generierung von polaren HBEPc auf Transwell-Filtern

HBEPcs können sich unter ALI-Zellkulturbedingungen in ein respiratorisches Epithel differenzieren, dass das Atemwegsepithel *in vivo* sehr gut repräsentiert. Die HBEPcs bilden ein mehrreihiges Epithel, das sich aus spezifischen Zelltypen, wie den Zilien-tragenden Zellen, Basalzellen, Becherzellen und Clubzellen, zusammensetzt (Ganesan et al., 2013; Gray et al., 1996). Somit eignen sich differenzierte HBEPcs, um die Infektionsprozesse von LASV in den humanen Atemwegen *in vitro* zu untersuchen.

Die erfolgreiche Etablierung dieses Zellkulturmodells konnte bereits in eigenen Vorarbeiten im Rahmen der Masterarbeit gezeigt werden (Müller, 2015). Die verwendeten HBEPcs stellten ausschließlich Zellen epithelialen Ursprungs dar und wiesen keine Kontamination mit Fibroblasten auf. Dafür wurde die Expression und die charakteristische zelluläre Verteilung von Zytokeratinen (CK), bei denen es sich um Intermediärfilamente handelt, die nur in Epithelzellen exprimiert werden (Blobel et al., 1984; Quinlan et al., 1985), untersucht (Abb. 5.2a). Zusätzlich waren in Immunfluoreszenzstudien mit einem Fibroblastenzellmarker keine TE-7 exprimierenden Zellen nachweisbar (Abb. 5.2b).

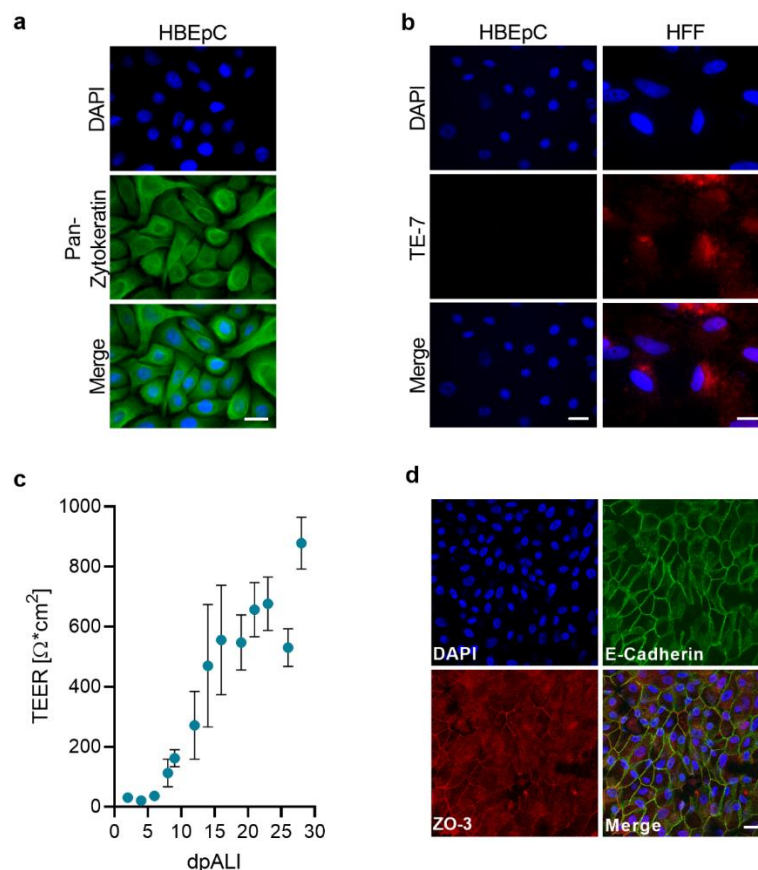


Abb. 5.2: Ausbildung eines polaren Phänotyps in HBEPcs. (a) Die Pan-Zytokeratin-Färbung, (b) die Färbung mit dem Fibroblastenmarker TE-7, (c) die Ausbildung eines transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) und (d) die Ausbildung der *Tight junctions* (ZO-3) und *Adherens junctions* (E-Cadherin) konnten bereits in eigenen Vorarbeiten gezeigt werden. Abbildungen übernommen aus (Müller, 2015).

Die Spezifität des TE-7 Antikörpers wurde mittels Färbung von humanen Vorhautfibroblasten (HFFs) kontrolliert. Durch die Ausbildung eines polaren Epithels wird der freie parazelluläre Ionenfluss unterbunden, was zur Ausbildung eines transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER von engl. *transepithelial electrical resistance*) führt. Die Höhe des TEER-Wertes korreliert dabei direkt mit dem Polarisierungsstatus des Epithels. Wie in Abb. 5.2c dargestellt, konnte bei den HBEPcs nach 28 Tagen unter den entsprechenden ALI-Zellkulturbedingungen, ein maximaler TEER-Wert von $878 \Omega \cdot \text{cm}^2$ bestimmt werden. Dies zeigt, dass sich die HBEPcs bereits ab diesem Zeitpunkt für polare Infektionsstudien eignen. Darüber hinaus lassen sich nach 35 Tagen unter ALI-Zellkulturbedingungen das *Tight Junction* (TJ)-Protein ZO-3 und das *Adherens Junction* (AJ)-Protein E-Cadherin nachweisen, was die Ausbildung eines hochpolarisierten Epithels bestätigt (Abb. 5.2d).

5.1.2 Charakterisierung des mehrreihigen Epithels aus HBEPcs

Für Untersuchungen zum LASV-Wirtszelltropismus in den humanen Atemwegen ist es erforderlich, dass die HBEPcs im Verlauf der Differenzierung ein mehrreihiges Epithel mit charakteristischen Zelltypen ausbilden, wie sekretorischen Becher- und Clubzellen, Basalzellen und Zilien-tragenden Zellen (Ganesan et al., 2013). Die Expression von spezifischen CK, die für den Differenzierungsstatus von Epithelzellen typisch sind (Moll et al., 1982), konnte bereits für differenzierte HBEPcs in eigenen Vorarbeiten beschrieben werden (Müller, 2015). Die Zytokeratine CK7 und CK8 werden von sekretorisch aktiven Epithelzellen des Respirationstraktes exprimiert (Moll et al., 2008), während CK17 ein Zellmarker für undifferenzierte Epithelzellen darstellt, wie beispielsweise Basalzellen (Trojanovsky et al., 1989). Die Expression aller drei untersuchten Zytokeratine deutet darauf hin, dass das ausgebildete Epithel aus differenzierten sekretorischen Zellen und undifferenzierten Basalzellen besteht (Abb. 5.3a). Um die differenzierten Epithelzellen näher zu charakterisieren, wurde die Expression der spezifischen Zellmarkerproteine für Basalzellen (p63), Zilien-tragenden Zellen (β -Tubulin), Becherzellen (TFF-3) und Clubzellen (CC16) in der Immunfluoreszenz untersucht. Wie in Abb. 5.3b gezeigt, waren alle vier Hauptzelltypen nachweisbar. Zusätzlich wurde die Expression der entsprechenden Zellmarkerproteine in nicht-differenzierten und differenzierten Kulturen (0 d und 50 d) in Western Blot-Analysen untersucht. Dabei zeigte sich, dass der Marker für Basalzellen (p63) hauptsächlich in nicht-differenzierten HBEPcs exprimiert wird, während β -Tubulin und CC16, die Marker für Zilien-tragende Zellen und Clubzellen, nur in differenzierten Zellen nachweisbar war (Abb. 5.3c). Die Bildung eines mehrreihigen Epithels mit einem apikalen Ziliensaum konnte nach einer histologischen Präparation der HBEPcs auf Transwell-Filtern mikroskopisch nachgewiesen werden (Abb. 5.3d). Eine weitere Eigenschaft des respiratorischen Epithels ist die Sekretion von Muzinen auf die apikale Oberfläche des Epithels durch sekretorische Becher- und Clubzellen. Daher wurde als Nächstes untersucht, ob sich spezifische Muzine im Verlauf der Epitheldifferenzierung nachweisen lassen. Um den Mukus anzureichern wurden die Zellen wöchentlich apikal gespült und nach

mehrfachen Aufreinigungsschritten mittels Western Blot-Analysen untersucht. Dabei wurde im Speziellen die Sekretion von MUC4 und MUC16 untersucht, die beide sowohl in Zell-assoziiierter als auch sezernierter Form vorkommen (Sheehan et al., 2006). In Abb. 5.3e ist gezeigt, dass die Muzine MUC4 und MUC16 bereits nach 16 Tagen unter ALI-Zellkulturbedingungen nachweisbar sind. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass HBEPs unter ALI-Zellkulturbedingungen ein mehrreihiges Epithel ausbilden, das aus differenzierten Zelltypen besteht und somit charakteristisch für ein humanes respiratorisches Epithel ist.

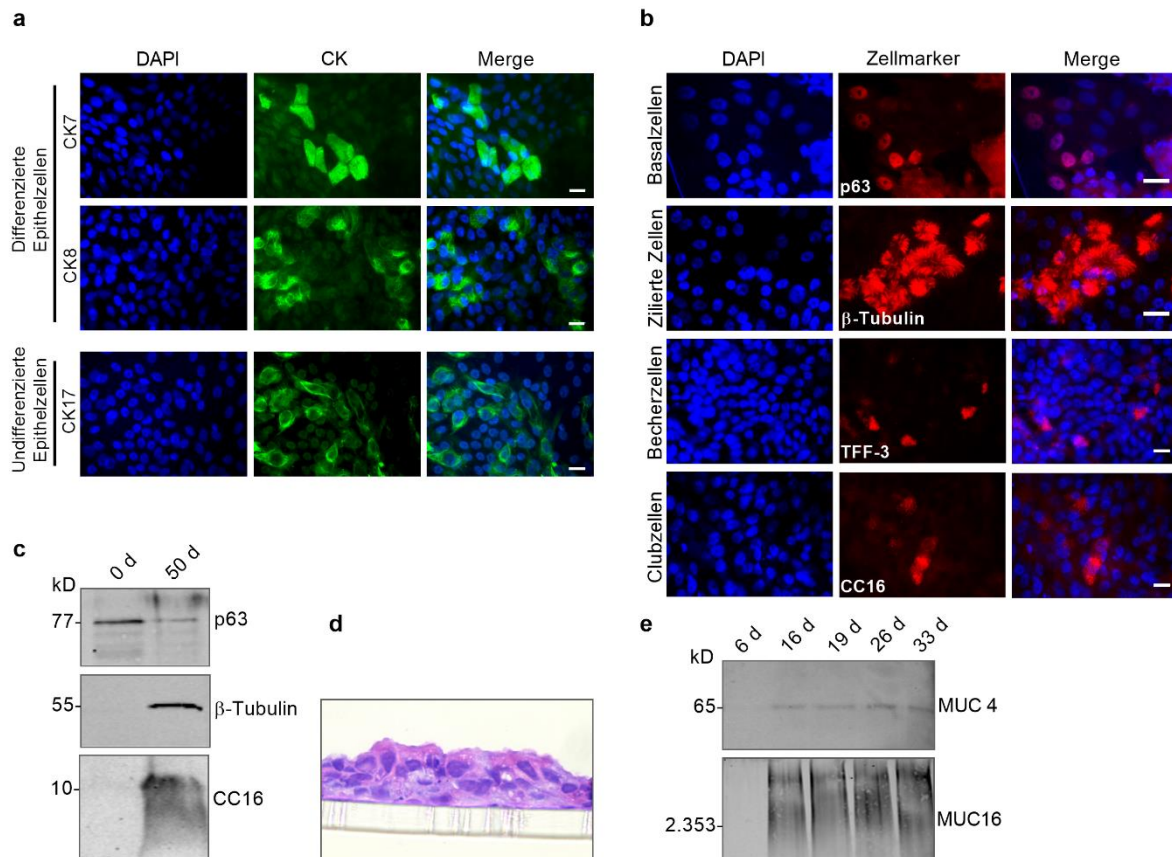


Abb. 5.3: Ausbildung eines differenzierten respiratorischen Epithels. HBEPs wurden auf Transwell-Filtern ausgesät und unter ALI-Bedingungen kultiviert. **(a)** Die Bilder zur spezifischen Zytokeratinfärbung (CK7, CK8 und CK17) wurden übernommen aus (Müller, 2015). **(b)** Immunfärbung spezifischer Marker für Basalzellen (p63), Zilien-tragende Zellen (β-Tubulin), Becherzellen (TFF-3) oder Clubzellen (CC16). Die Kerne wurden mit DAPI dargestellt und der Maßstabsbalken beträgt 20 µm. **(c)** Nachweis von p63, β-Tubulin und CC16 in nicht-differenzierten HBEPs (0 d) und differenzierte HBEPs (50 d) in Western Blot-Analysen. **(d)** HBEPs wurden auf Transwell-Filtern kultiviert und nach der Differenzierung histologisch präpariert und mit Hämalaun und Eosin gefärbt. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch mit 400-facher Vergrößerung. **(e)** HBEPs in ALI-Kultur wurden wöchentlich gespült und die apikal sezernierten Muzine (MUC4 und MUC16) wurden mittels Western Blot analysiert.

5.1.3 Bipolarer Viruseintritt und gerichtete LASV-Freisetzung aus polaren Epithelzellen

Die Zellen des respiratorischen Epithels bilden durch TJ ein apikales und basolaterales Membrankompartiment, das je nach Virus für die Infektion von Epithelzellen genutzt werden kann. Um zu untersuchen, über welche Seite das LASV bevorzugt die Zellen des respiratorischen Epithels infiziert, wurden differenzierte HBEpCs entweder von der apikalen oder der basalen Seite mit infektiösem LASV unter BSL4-Bedingungen infiziert und die Virusreplikation nach 48 h in der Immunfluoreszenz untersucht. Bei beiden Infektionswegen ließen sich LASV NP-positive Infektionsherde nachweisen (Abb. 5.4a). Diese Ergebnisse zeigen, dass das LASV über beide Infektionsrouten in das Atemwegsepithel eindringen kann. Als Nächstes wurde untersucht, über welche Membranseite das LASV bevorzugt freigesetzt wird. Dafür wurden HBEpCs entweder über die apikale oder basolaterale Seite mit LASV infiziert und der Virustiter aus dem unteren und oberen Kompartiment mittels TCID₅₀ bestimmt. In Bezug auf die Gesamtvirusfreisetzung führte die Infektion sowohl über die apikale als auch die basolaterale Seite zu vergleichbaren Virustitern (Abb. 5.4b, Gesamte Virusfreisetzung). Somit konnte bestätigt werden, dass LASV in der Lage ist, das Bronchialepithel von beiden Seiten zu infizieren. Zusätzlich deuten die Größe der Infektionsherde und der Anstieg des viralen Titers auf eine multizyklische Replikation hin. Als Nächstes wurde untersucht, ob die Virusfreisetzung bevorzugt über eine Seite des Epithels erfolgt. Dafür wurden die Virustiter im apikalen und basolateralen Medium miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass die Virusfreisetzung bevorzugt über die apikale Membran erfolgt, sowohl nach einer apikalen, als auch nach einer basolateralen Infektion (Abb. 5.4b, apikale und basolaterale Infektion). Eine verstärkte Virusfreisetzung über die apikale Membran und somit auf die Schleimhautoberflächen der Atemwege könnte zu einer Virusübertragung durch Aerosole beitragen.

Es konnte bereits für zahlreiche Viren gezeigt werden, dass neben dem Matrixprotein auch das Glykoprotein eine wichtige Determinante für die gerichtete Virusfreisetzung in polaren Epithelzellen ist (Choppin und Scheid, 1980; Naim et al., 2000; Schlie et al., 2010a). Daher wurde als Nächstes untersucht, ob die Infektionsroute einen Einfluss auf die zelluläre Lokalisation von LASV GP im polaren Epithel hat. Dafür wurden differenzierte HBEpCs entweder über die apikale oder die basolaterale Seite mit LASV infiziert und nach 4 Tagen wurde das GP angefärbt und die zelluläre Lokalisation mittels konfokaler Mikroskopie untersucht (Abb. 5.4c). Unabhängig von der Infektionsroute scheint das LASV GP spezifisch an der apikalen Plasmamembran von differenzierten Atemwegsepithelzellen lokalisiert zu sein, was in Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen in polaren MDCK II-Zellen ist (Schlie et al., 2010a). Beide dargestellten Infektionsherde weisen eine radiale Virusausbreitung auf, bei der nur die benachbarten Zellen infiziert zu sein scheinen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass sich auf der apikalen Oberfläche der Zellen kein Zellkulturmedium befindet und die zähe Konsistenz der Muzine eine diffuse Virusausbreitung erschwert.

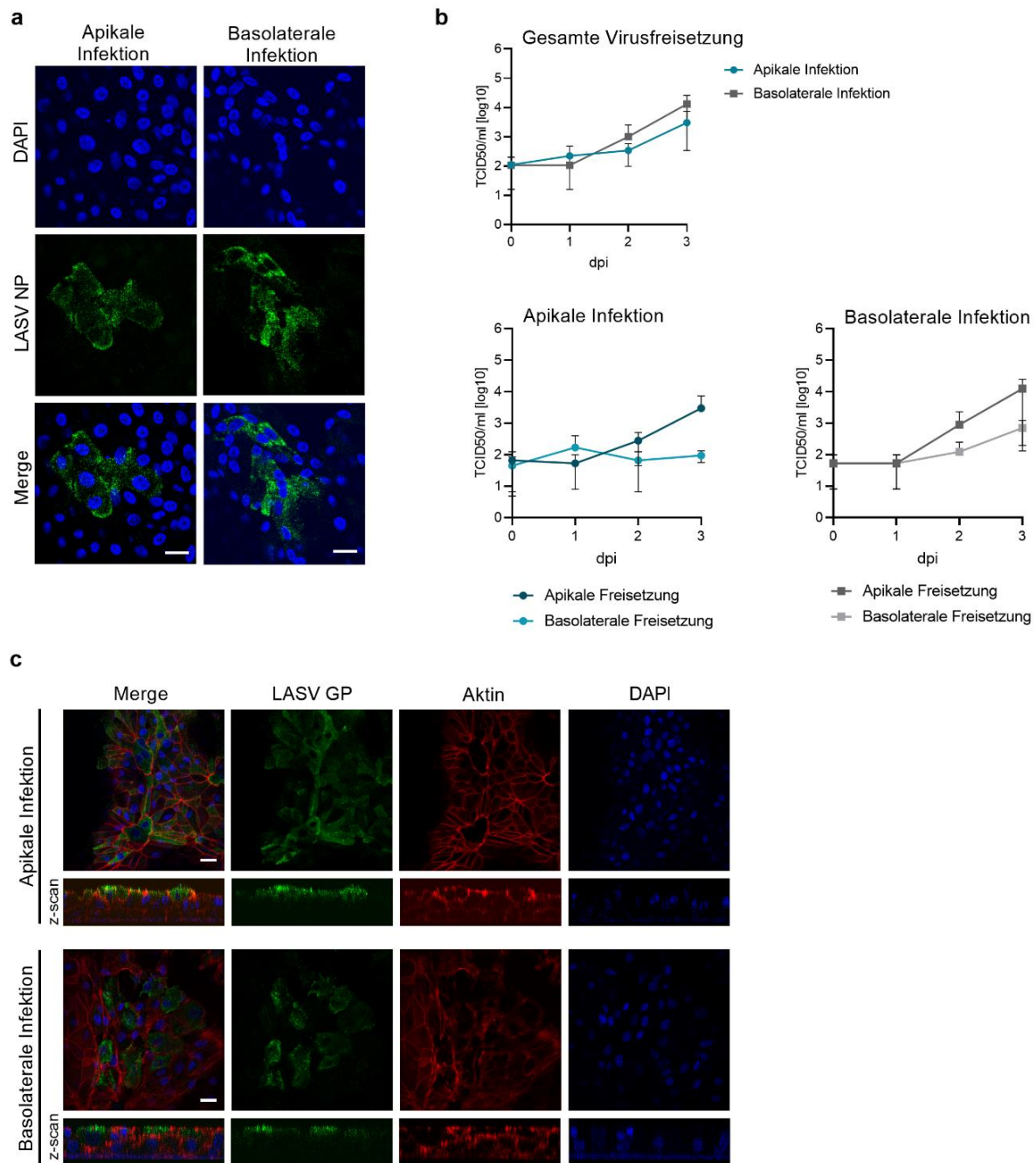


Abb. 5.4: LASV-Eintritt und Freisetzung in differenzierten HBEPs (a) HBEPs wurden auf Transwell-Filter ausgesät und über die apikale oder die basolaterale Seite mit $2,4 \times 10^4$ PFU LASV infiziert. Die infizierten Zellen wurden 48 h nach der Infektion mit 4% PFA fixiert und mit einem Kaninchen anti-LASV NP Antikörper gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und der Maßstabsbalken beträgt 20 μ m. **(b)** HBEPs wurden mit $1,25 \times 10^5$ PFU LASV entweder über die apikale oder die basolaterale Seite infiziert. Die Gesamtvirustiter, addiert aus dem apikalen und basalen Medium, oder die Virustiter aus dem apikalen und basalen Medium nach Infektion über die apikale oder basolaterale Seite wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Infektion (dpi, *days post infection*) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung (SD) von drei unabhängigen Experimenten. **(c)** HBEPs wurden mit $2,4 \times 10^4$ PFU LASV über die apikale oder die basolaterale Seite infiziert, nach 4 Tagen mit 4% PFA fixiert und das LASV GP mit dem humanen anti-LASV GP Antikörper (37.7H) angefärbt. Die Aktin-Filamente wurden durch Phalloidin-TRITC und die Zellkerne mit DAPI gefärbt. Der Maßstabsbalken beträgt 25 μ m.

5.1.4 LASV-Ausbreitung in die Submukosa des respiratorischen Epithels

Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Virusfreisetzung nach apikaler und basolateraler Infektion hauptsächlich über die apikale Membranseite erfolgt. Erst in einem späteren Stadium der Infektion sind geringe Virustiter auch in dem basolateralen Medium nachweisbar. Für das Masernvirus wurde *in vivo* gezeigt, dass das respiratorische Epithel überwunden wird, indem die Viren von dendritischen Zellen oder Alveolarmakrophagen aufgenommen und zu regionalen Lymphknoten transportiert werden (de Swart et al., 2007). Da das hier verwendete Zellkultursystem ausschließlich aus respiratorischen Epithelzellen besteht, ist dieser Mechanismus zur Überwindung der Epithelbarriere für LASV auszuschließen. Daher wurde als Nächstes untersucht, ob die LASV-Replikationen einen Einfluss auf die Epithelintegrität hat und es so zu einer basolateralen Virusfreisetzung kommt. Dafür wurden HBEPs über die apikale Seite mit LASV infiziert, nach 4 Tagen fixiert und das LASV GP und die Aktin-Filamente gefärbt. Die Auswertung erfolgte mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie. Durch die Verwendung einer geringen Infektionsdosis (MOI 0,1) waren

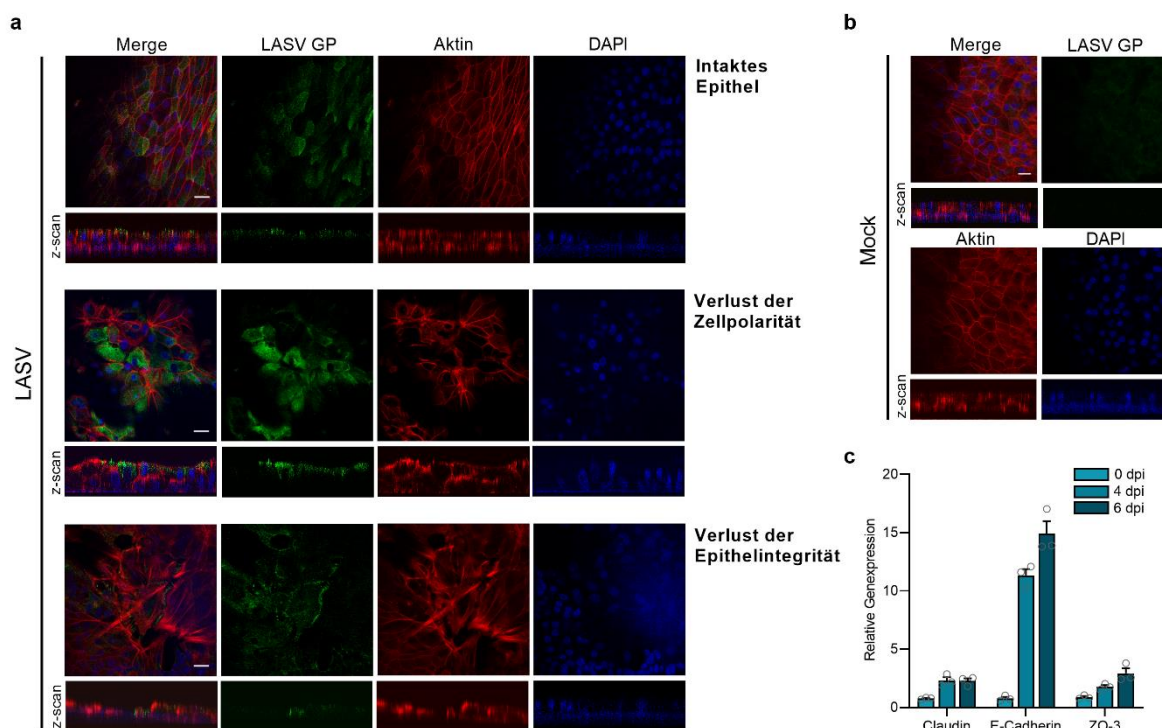


Abb. 5.5: LASV-Ausbreitung in die Submukosa. HBEPs wurden mit $2,4 \times 10^4$ PFU LASV über die apikale Seite infiziert. Die infizierten Zellen (**a**) oder Mock-Zellen (**b**) wurden nach 4 Tagen mit 4% PFA fixiert, und LASV GP mit einem humanen anti-LASV GP Antikörper (37.7H) nachgewiesen. Die Aktinfilamente wurden mit Phalloidin-TRITC und die Zellkerne mit DAPI gefärbt. Der Maßstabsbalken beträgt 25 μ m. (**c**) Differenzierte HBEPs wurden simultan über die apikale und basolaterale Membran mit $1,2 \times 10^5$ PFU LASV infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zelllysate geerntet und die Gesamt-RNA isoliert. Die Expression von TJ- und AJ-Protein wurde mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und der SEM von drei biologischen Replikaten.

noch nicht alle Zellen des mehrreihigen Epithels infiziert, sodass unterschiedlich fortgeschrittene Stadien der Virusausbreitung unterschieden werden konnten (Abb. 5.5a). In einem frühen Stadium der Virusausbreitung wirkt die Epithelintegrität noch intakt und das LASV GP nur an der apikalen Membran lokalisiert zu sein (Abb. 5.5a, oberer Teil), was in Übereinstimmung mit einer vorwiegend apikalen Virusfreisetzung ist. Im Verlauf der Infektion scheint die reguläre Anordnung der Aktin-Filamente nicht mehr intakt zu sein, was auf eine geänderte Organisation des Aktin-Zytoskeletts hindeutet (Abb. 5.5a, mittlerer Teil). Dies hat einen möglichen Verlust der Zellpolarität zur Folge, sodass LASV GP nun in dem gesamten apikalen Teil der Zelle lokalisiert ist. Die kontinuierliche Virusvermehrung scheint zu einem ausgeprägten Verlust der Zell-Zell-Verbindungen zu führen und somit zu einem Loslösen der infizierten Zellen aus dem Zellverband (Abb. 5.4a, unterer Teil). Der Verlust der Zellpolarität führt dazu, dass das LASV GP an der gesamten Zellmembran lokalisiert ist und es somit möglicherweise zu einer basolateral-gerichteten Virusfreisetzung in die Submukosa kommt. Der Verlust der Epithelintegrität scheint durch die LASV-Infektion bedingt zu sein, da dieser CPE in nicht-infizierten Zellen nicht beobachtet wurde (Abb. 5.5b). Die Zerstörung der Epithelintegrität kann durch unterschiedliche Mechanismen verursacht werden. Zum einen könnte es durch virale Faktoren zu einer reduzierten TJ- und AJ-Proteinexpression gekommen sein. Zum anderen könnte die Virusinfektion einen direkten Einfluss auf die Zellviabilität haben. Daher wurde die Expression von TJ- und AJ-Proteinen im Verlauf der LASV-Infektion untersucht. Dafür wurden differenzierte HBEPcs simultan über die apikale und basolaterale Membran mit LASV infiziert und an 0, 4 und 6 Tagen nach Infektion wurde das Expressionsniveau von TJ- und AJ-Proteinen mittels qPCR bestimmt. Dabei wurden die TJ-Proteine Claudin-1 (verbindet die Membranen benachbarter Zellen miteinander), ZO-3 (verankert die Transmembranproteine am Zytoskelett) sowie das AJ-Protein E-Cadherin untersucht (Bajpai et al., 2008; Drees et al., 2005; Rao, 2009). Die TJ-Proteinexpression scheint im Verlauf der LASV-Infektion in HBEPcs nicht herunterreguliert zu werden. Im Gegenteil, die Infektion führt zu einer leichten Erhöhung der Expression dieser Proteine (Abb. 5.5c). Im Vergleich dazu wird interessanterweise die Expression von E-Cadherin 4 Tage nach der Infektion stark induziert. Wie in obigen Ergebnissen gezeigt, führt die LASV-Infektion zu einem ausgeprägten CPE, der mit einem Epithelzellverlust einhergeht. Infizierte Zellen könnten durch die Induktion von E-Cadherin, das es eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zellproliferation und Zelldifferenzierung spielt, dem Verlust der Epithelintegrität entgegensteuern (Qian et al., 2004).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die LASV-Infektion in HBEPcs zu einem Verlust der Epithelintegrität führt und somit für eine basolaterale Virusfreisetzung in die Submukosa ursächlich sein könnte.

5.1.5 LASV-Wirtszelltropismus in humanen bronchialen Epithelzellen

Das bronchiale Atemwegsepithel setzt sich aus unterschiedlichen Zelltypen zusammen, wie den Zilien-tragenden Zellen, den Becherzellen, den Clubzellen und Basalzellen. Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, welche Zelltypen für eine initiale LASV-Infektion empfänglich sind. Da das lassavirale GP den Viruseintritt vermittelt und somit die Hauptdeterminante für den Wirtszelltropismus des LASV ist, wurde das replikationskompetente VSVΔG/LASVGP verwendet. Dabei handelt es sich um VSV, das an Stelle des wildtypischen VSV Glykoprotein G das LASV GP exprimiert. Dieses Surrogatsystem eignet sich für Studien zum LASV GP-abhängigen Viruseintritt unter BSL2-Bedingungen (Garbutt et al., 2004). Zunächst wurde untersucht, ob das rekombinante Virus ebenfalls in der Lage ist, das respiratorische Epithel über die apikale und basolaterale Seite zu infizieren. Unabhängig von der Seite des Viruseintritts zeigte VSVΔG/LASVGP eine mehrzyklische Replikation in HBEpC-Zellen, was auf einen effektiven GP-vermittelten Viruseintritt über beide Seiten hinweist (Abb. 5.6a). Für die Untersuchungen zum Wirtszelltropismus wurden die differenzierten HBEpCs mit VSVΔG/LASVGP entweder von der apikalen oder der basolateralen Seite infiziert und für die Dauer eines Replikationszyklus inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen fixiert und die viralen Proteine sowie die entsprechenden Zellmarker gefärbt. Bei der VSVΔG/LASVGP-Infektion über die apikale Seite konnte keine Ko-Färbung mit den untersuchten Zellmarkern und den viralen Proteinen detektiert werden. Somit konnten weder Zilien-tragende Zellen, noch TFF-3-positive Becherzellen oder CC16-positive Clubzellen als initiale Zielzellen identifiziert werden (Abb. 5.6b). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das humane Bronchialepithel zwar als Eintrittspforte für das LASV nach einer respiratorischen Übertragung dienen kann, der Wirtszelltropismus nach einer apikalen Infektion jedoch wahrscheinlich auf bislang nicht definierte nicht-Zilien-tragende Zellen beschränkt ist. Basalzellen sind für die Regeneration des respiratorischen Epithels verantwortlich und befinden sich ausschließlich im basolateralen Bereich. Diese Zellen sind somit für eine VSVΔG/LASVGP-Infektion über die apikale Seite nicht zugänglich (Abb. 5.6b). Das deutet darauf hin, dass die Basalzellen nicht als anfängliche Zielzellen für Viren dienen konnten, die von der apikalen/luminalen Seite in den Respirationstrakt eindringen. Bei einer Infektion über die basolaterale Seite konnte eine Infektion der CK17-positiven Basalzellen mit VSVΔG/LASVGP hingegen eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 5.6c). Ebenso konnte eine Ko-Färbung der viralen Proteine mit CC16 detektiert werden, was auf eine initiale Infektion der Clubzellen nach einem basolateralen Viruseintritt hindeutet.

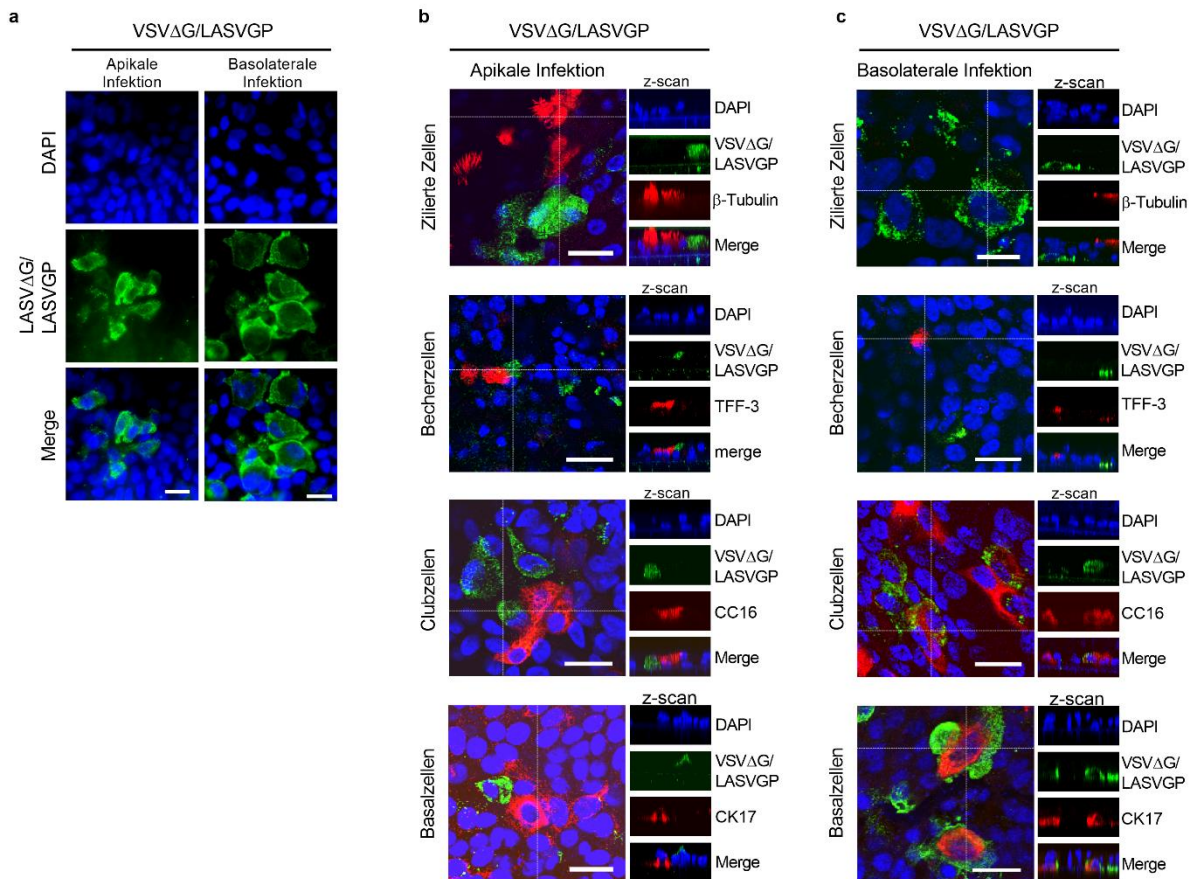


Abb. 5.6: LASV-Wirtszelltropismus in den humanen Atemwegen. (a) HBEpCs wurden 24 Tage auf Transwell-Filtern unter ALI-Bedingungen kultiviert und mit $2,2 \times 10^6$ PFU VSVΔG/LASVGP über die apikale oder die basolaterale Seite infiziert. Nach 14 h wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert und viruspositive Zellen wurden mit einem polyklonalen Kaninchen anti-VSV Serum gefärbt. (b, c) HBEpC wurden mit $2,2 \times 10^6$ PFU von VSVΔG/LASVGP über die apikale (b) oder die basolaterale (c) Route infiziert und 12 h inkubiert. Spezielle Zellen wurden gefärbt mit β-Tubulin (Zilierte Zellen), TFF-3 (Becherzellen), CC16 (Clubzellen) und CK17 (Basalzellen). VSVΔG/LASVGP-infizierte Zellen wurden mit einem polyklonalen Kaninchen anti-VSV Serum gefärbt. Ko-Lokalisation sichtbar durch gelbe Färbung oder im z-scan. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Der Maßstabsbalken beträgt 20 µm.

Da jedoch keine Infektion der Zilien-tragenden Zellen beobachtet werden konnte, wurden die HBEpCs zur Kontrolle mit H3N2-R2 IAV infiziert. Für diesen IAV Subtyp wurde bereits eine Infektion von Zilien-tragenden Zellen beschrieben (Matrosovich et al., 2007). Dies konnte mit dem hier verwendeten Zellkulturmodell aus differenzierten HBEpCs bestätigt werden (Abb. 5.7a). Um sicherzustellen, dass der Zelltropismus von VSVΔG/LASVGP alleinig durch das LASV GP vermittelt wird, wurden parallel dazu Infektionsstudien mit wildtypischen VSV durchgeführt. Die VSV-Infektion ließ sich in allen untersuchten Zelltypen beobachten (Abb. 5.7b). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der initiale Zelltropismus des LASV von der Infektionsroute abhängt. Während noch nicht identifizierte, nicht-Zilien-tragende Zellen bei einem apikalen Viruseintritt infiziert werden, kommt es bei einem basolateralen Viruseintritt initial zu einer Infektion der Basal- und Clubzellen.

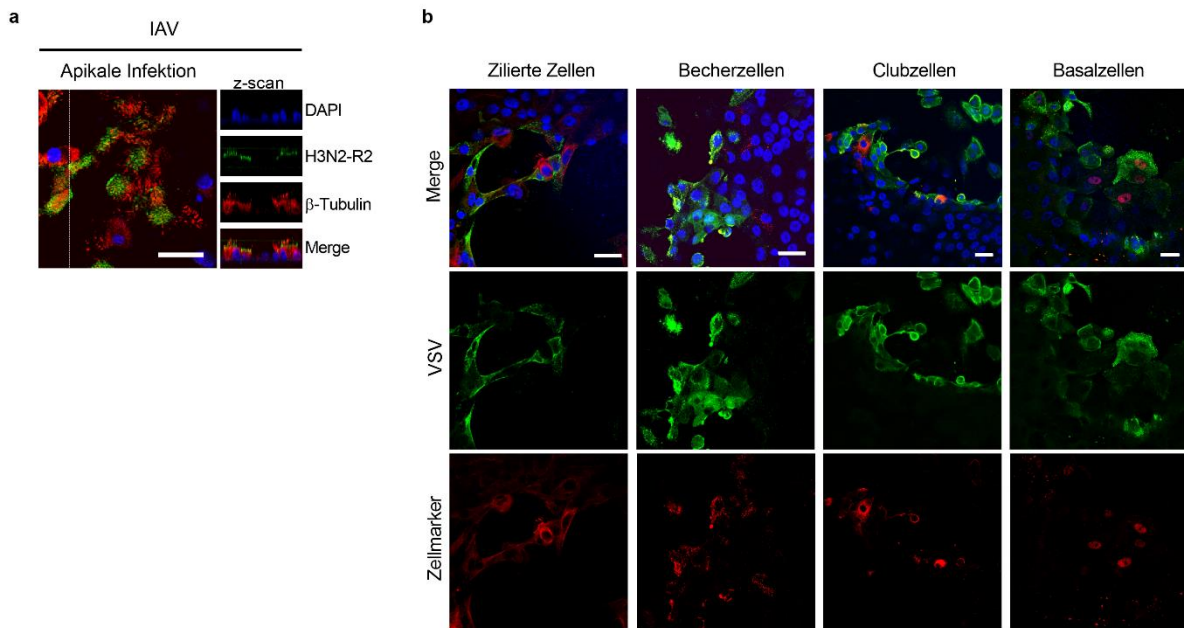


Abb. 5.7: Wirtszelltropismus von IAV und VSV in HBEpCs. (a) Differenzierte HBEpC wurden auf Transwell-Filtern kultiviert, mit $2,6 \times 10^5$ PFU IAV H3N2-R2 über die apikale Route infiziert und für 8 h inkubiert. Zilien-tragende Zellen (β -Tubulin, rot) wurden mit IAV H3N2-R2 (NP, grün) angefärbt. Der Maßstabsbalken beträgt 20 μ m. (b) HBEpC wurden mit $1,2 \times 10^5$ PFU VSV über die apikale und basolaterale Route infiziert und für 12 h inkubiert. Spezielle Zellen wurden gefärbt mit β -Tubulin (Zilierte Zellen), TFF-3 (Becherzellen), CC16 (Clubzellen) und CK17 (Basalzellen). VSVΔG/LASVGP-infizierte Zellen wurden mit einem polyklonalen Kaninchen anti-VSV Serum gefärbt. Ko-Lokalisation sichtbar durch gelbe Färbung. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Der Maßstabsbalken beträgt 25 μ m.

5.1.6 Atemwegsmuzine haben keinen hemmenden Effekt auf eine LASV GP-vermittelte Infektion

Das respiratorische Epithel besteht u.a. aus sekretorischen Zellen, die Muzine auf die apikale Oberfläche der Zellen sezernieren und so eine Barriere für Pathogene schaffen. Durch die Sialinsäuren im Mukus kann es zu einer kompetitiven Hemmung des IAV kommen, bei der das Virus an die Sialinsäuren im Mukus bindet anstatt an die zellulären Rezeptoren (Gerlach et al., 2012). In massenspektrometrischen Analysen des humanen Atemwegsmukus konnte der LASV-spezifische Rezeptor α -DG nachgewiesen werden (Kesimer et al., 2009). Daher wurde im Folgenden untersucht, ob der angereicherte Mukus von der Oberfläche der differenzierten HBEpCs den LASV-Eintritt inhibieren kann. Dafür wurde die apikale Oberfläche der HBEpCs wöchentlich mit warmem PBS^{def} gespült und der Überstand durch mehrfaches Zentrifugieren angereichert. Um zu kontrollieren, ob der gesammelte Mukus ausreichend konzentriert für Hemmstudien vorliegt, wurde zunächst ein IAV-Hemmtest durchgeführt. Der Mukus wurde hierfür seriell verdünnt, mit dem pandemischen IAV Ham/09 inkubiert und anschließend auf MDCK II-Zellen gegeben. Die virusinfizierten Zellen wurden immunhistochemisch gefärbt und im Anschluss lichtmikroskopisch ausgewertet. Als Kontrolle diente die Auswertung von infizierten Zellen, die mit IAV Ham/09 ohne Mukus-Vorbehandlung inkubiert wurden.

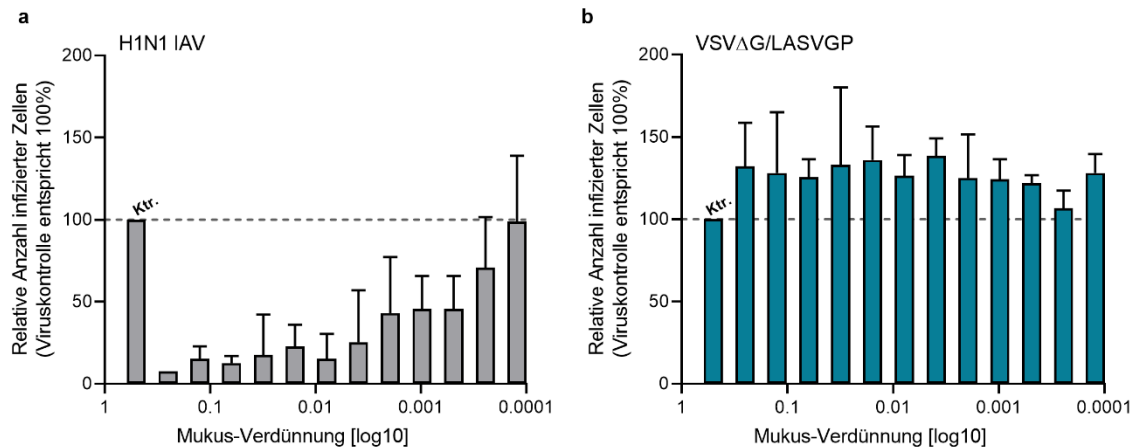


Abb. 5.8: Virusinhibitionstest mit Atemwegsmukus. MDCK II- **(a)** oder Vero E6-Zellen **(b)** wurden in eine Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen ausgesät und 24 h lang kultiviert. Atemwegsmukus aus dem apikalen Überstand von HBEPs wurde seriell verdünnt, mit 800 FFU IAV Ham/09 (a) oder 800 PFU VSVΔG/LASVGP (b) inkubiert und auf die entsprechenden Zellen gegeben. Nach 8 h wurden die Zellen fixiert und die IAV- oder VSVΔG/LASVGP-infizierte Zellen wurden mit anti-IAV-NP (a) oder anti-VSV Serum (b) gefärbt. Die Anzahl der infizierten Zellen pro Vertiefung wurde am Lichtmikroskop quantifiziert. Die gestrichelten Linien geben die Anzahl der infizierten Zellen in den Kontrollproben (Virus ohne Mukus-Vorinkubation), auf 100% gesetzt, an. Dargestellt sind die Mittelwerte und SD von drei verschiedenen Vertiefungen.

In Übereinstimmung mit publizierten Beobachtungen (Gerlach et al., 2012), ist eine mengenabhängige Inhibition von IAV durch humanen Mukus zu erkennen (Abb. 5.8a). Um die inhibitorische Wirkung des Atemwegsmukus auf eine LASV-Infektion zu untersuchen, wurde VSVΔG/LASVGP mit seriell verdünntem Mukus vorinkubiert und auf Vero E6-Zellen gegeben. Im Gegensatz zur Infektion mit IAV hat der bronchiale Mukus allerdings keinen hemmenden Einfluss auf die VSVΔG/LASVGP-Infektion (Abb. 5.8b). Um zu untersuchen, ob diese Beobachtung nur auf Vero E6-Zellen beschränkt ist, wurde zusätzlich ein Virusinhibitionstest mit A549-Zellen durchgeführt. Dabei zeigte sich bei der qualitativen Auswertung, dass A549-Zellen im Vergleich zu Vero E6-Zellen bei einer vergleichbaren Infektionsdosis von 800 PFU für eine VSVΔG/LASVGP-Infektion empfänglicher sind (Abb. 5.9a). Als Nächstes wurde der Virusinhibitionstest in A549-Zellen mit den Infektionsdosen 50, 100 und 200 PFU VSVΔG/LASVGP pro Vertiefung durchgeführt. Dabei sollte ausgeschlossen werden, dass eine hohe Rezeptordichte auf der Zelloberfläche oder eine zu hohe Infektionsdosis einen potenziell hemmenden Effekt überdeckt. Bei dem mikroskopischen Vergleich der VSVΔG/LASVGP-Infektion mit und ohne Mukus-Vorinkubation in A549-Zellen, konnte bei keiner der verwendeten Infektionsdosen eine Reduktion der virusinfizierten Zellen durch eine Vorinkubation mit humanem Mukus beobachtet werden (Abb. 5.9b). Bei der quantitativen Auswertung des Versuchsansatzes mit der geringsten Infektionsdosis (50 PFU) und der höchsten Mukuskonzentration, entsprach die Anzahl der infizierten Zellen mit Mukus der Anzahl der infizierten Zellen in der Viruskontrolle (Abb. 5.9c). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der bronchiale Mukus keinen inhibitorischen Effekt auf den LASV-Eintritt zu haben scheint.

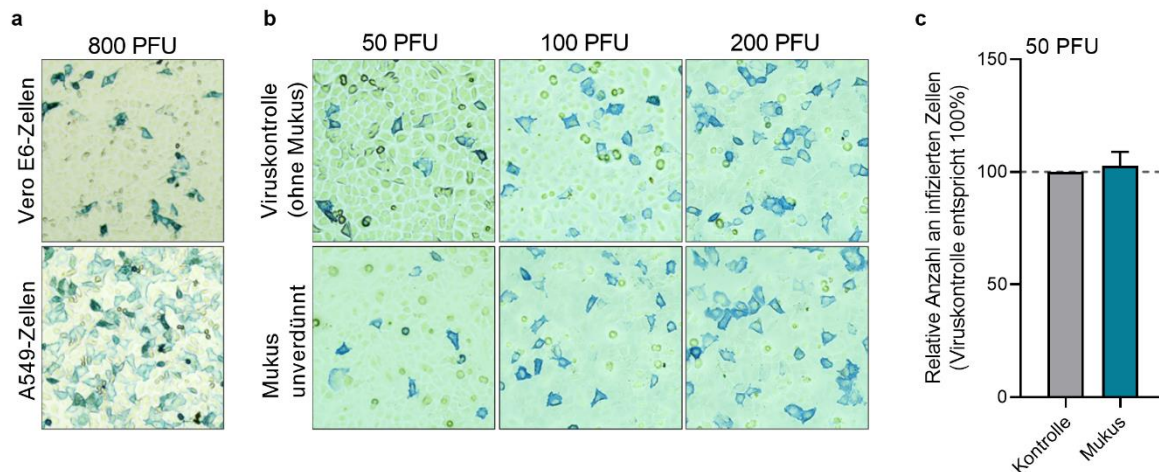


Abb. 5.9: Mukusinhibitionstest in A549-Zellen. (a) A549- und Vero E6-Zellen wurden mit 800 PFU VSVΔG/LASVGP infiziert. Nach 8 h wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert und mit einem Kaninchen anti-VSV Serum gefärbt. (b) Unverdünnter Mukus oder PBS wurden mit 50, 100 oder 200 PFU VSVΔG/LASVGP inkubiert und auf A549-Zellen gegeben. Nach 8 h wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert und mit einem Kaninchen anti-VSV Serum gefärbt. Die Auswertung erfolgte am Lichtmikroskop bei einer 100-fachen Gesamtvergrößerung. (c) Exemplarisch gezeigt ist die quantitative Auswertung der infizierten Zellen bei einer Infektionsdosis von 50 PFU (rechter Graph). Dargestellt sind die Mittelwerte und die SD aus drei verschiedenen Vertiefungen.

5.1.7 IFN-Induktion in humanen bronchialen Epithelzellen nach einer LASV-Infektion

Obwohl der humane Respirationstrakt eine wichtige Eintrittspforte bei der Übertragung des LASV vom Nagetier auf den Menschen darstellt, wurde die Induktion einer angeborenen Immunantwort im LASV-infizierten respiratorischen Epithel bislang nur im Tiermodell (Mordstein et al., 2010) oder in Immunzellen (Safronetz et al., 2013) untersucht. Zusätzlich zu Typ I IFN (IFN- α/β) können respiratorische Epithelzellen auch Typ III IFN (IFN- λ) sezernieren und über spezielle Rezeptoren davon stimuliert werden (Mordstein et al., 2010). Um die Rolle der IFN bei einer LASV-Infektion in den humanen Atemwegen zu untersuchen, wurden zunächst nicht-differenzierte HBEpCs mit LASV infiziert und die Induktion von IFN- α/β und IFN- λ mittels qPCR bestimmt. In Abb. 5.10a (linker Graph) ist gezeigt, dass eine LASV-Infektion zu einer spezifischen IFN- λ -Induktion führt, wohingegen IFN- α und IFN- β nicht induziert werden. Ähnliche Ergebnisse wurden für Infektionsstudien mit dem Nipahvirus in HBEpCs beschrieben (Sauerhering et al., 2017). Interessanterweise scheint die IFN- λ -Induktion verzögert einzusetzen, da eine robuste Expression erst zwei Tage nach Infektion zu beobachten ist, obwohl ein hoher Virustiter bereits einen Tag nach Infektion messbar war (Abb. 5.10a, rechter Graph). Die Zelldifferenzierung und somit die Ausbildung eines polaren Epithels kann die Virus-induzierte angeborene Immunantwort qualitativ und quantitativ beeinflussen (Lopez-Souza et al., 2004). Um dies zu untersuchen, wurden differenzierte HBEpCs simultan über die apikale und basolaterale Seite mit LASV infiziert und die IFN-Induktion mittels qPCR bestimmt (Abb. 5.10b, linker Graph). Dabei konnte

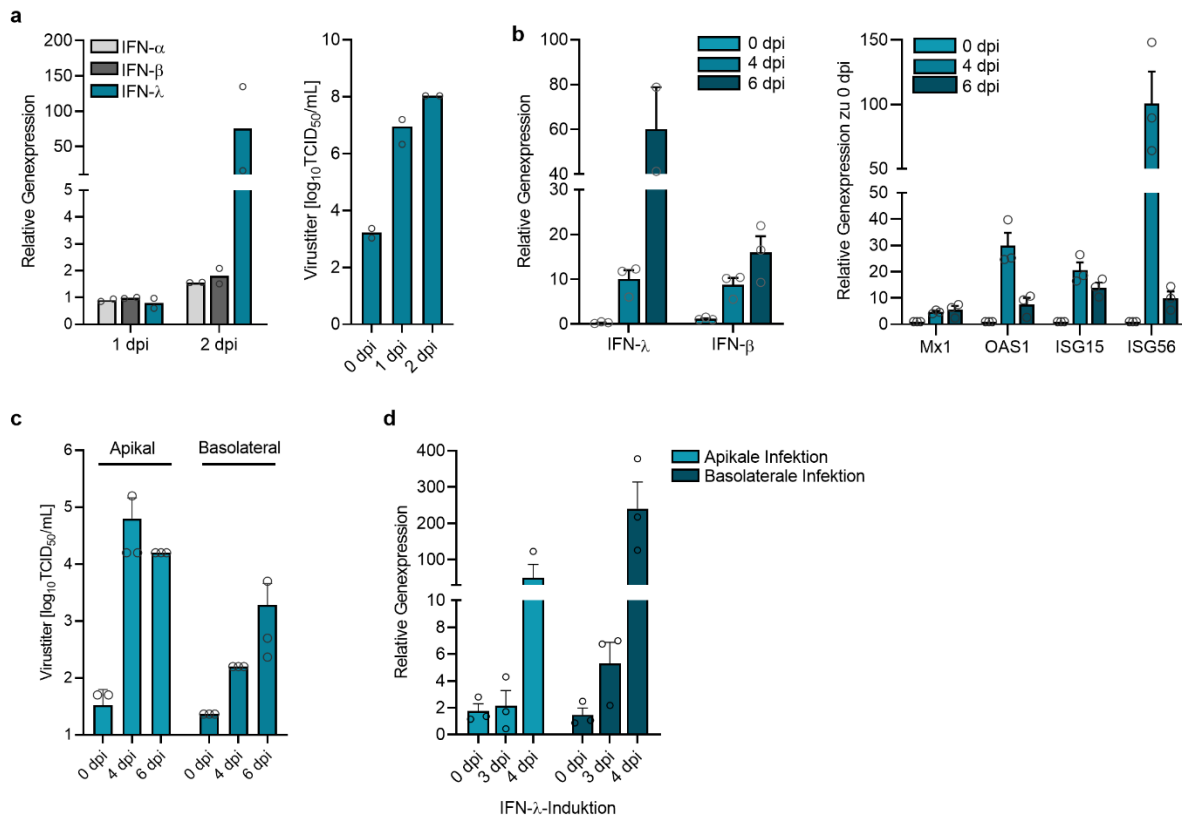


Abb. 5.10: IFN-Induktion in HBEpCs durch eine LASV-Infektion. (a) HBEpCs wurden in eine Zellkulturplatte mit 6 Vertiefungen ausgesät und mit $2,4 \times 10^4$ PFU LASV infiziert. Das IFN-Expressionsniveau wurde mittels qPCR bestimmt und auf die Expression von GAPDH normalisiert. Dargestellt ist die Expression in Relation zur unbehandelten Probe (linker Graph). Der Virustiter wurde aus den Überständen mittels TCID₅₀ bestimmt (rechter Graph). Dargestellt sind die Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten. (b, c) Differenzierte HBEpC wurden simultan über die apikale und basolaterale Seite mit $1,2 \times 10^5$ PFU LASV infiziert. Die Induktion von IFN- λ und IFN- β , sowie ISGs wurde durch qPCR bestimmt (b). Die Gesamtvirusfreisetzung wurde mittels TCID₅₀ zu den entsprechenden Zeitpunkten bestimmt (c). Dargestellt sind die Mittelwerte und die SEM von drei biologischen Replikaten. (d) Differenzierte HBEpCs wurden über die apikale oder basolaterale Seite mit $1,2 \times 10^5$ PFU LASV infiziert und die IFN- λ -Induktion wurde mittels quantitativer PCR bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und mittleren Standardfehler (SEM) von drei unabhängigen Experimenten.

ebenfalls beobachtet werden, dass IFN- β nicht induziert wird, während die Induktion von IFN- λ und ISGs bereits in einem frühen Stadium der Infektion einsetzt (Abb. 5.10b, rechter Graph).

Trotz der Induktion von IFN- λ findet in den HBEpC eine multizyklische LASV-Replikation mit einer effizienten Virusfreisetzung über die apikale und basolaterale Membran statt (Abb. 5.10c). Die Detektion von viraler RNA kann grundsätzlich über RIG-I oder endosomales TLR3 erfolgen (Alexopoulou et al., 2001; Saito und Gale, 2008). Die Aktivierung dieser sogenannten *pattern recognition* Rezeptoren (PRR) führt zu einer Signalkaskade, die in der transkriptionellen Aktivierung von IFN und ISGs resultiert. In polarisierten HBEpCs wird TLR3 auf der apikalen und basalen Zelloberfläche sowie im Zytoplasma der Epithelzellen exprimiert, wobei sowohl die Rezeptoren auf der Zelloberfläche als auch die endosomalen Rezeptoren an der Erkennung von dsRNA in humanen

Atemwegsepithelzellen beteiligt sind (Ioannidis et al., 2013). Da das LASV das Atemwegsepithel über die apikale und basolaterale Membran infizieren kann, wurde als Nächstes untersucht, ob die Infektionsroute einen Einfluss auf die IFN- λ -Induktion hat. Dafür wurden differenzierte HBEPs entweder über die apikale oder die basolaterale Seite mit LASV infiziert und anschließend die IFN- λ -Induktion analysiert. Hierbei zeigte sich, dass die IFN- λ mRNA-Expression zwar bei beiden Infektionswegen induziert wird, der basolaterale Viruseintritt aber eine deutlich höhere IFN- λ -Expression induzierte (Abb. 5.10c). Dies deutet darauf hin, dass die Erkennung viraler RNA und die daraus resultierende IFN-Induktion in stärkerem Maße induziert wird, wenn das LASV das respiratorische Epithel über die basolaterale Membranseite infiziert.

5.1.8 IFN- λ -Vorstimulation reduziert die LASV-Replikation in HBEPs

Bei einer LASV-Infektion der HBEPs konnte eine Induktion von Typ III IFN, aber nicht Typ I IFN beobachtet werden. Somit stellt IFN- λ einen wichtigen zellulären Faktor für die angeborene antivirale Immunantwort bei einer LASV-Infektion der humanen Atemwege dar. Daher wurde als Nächstes untersucht, ob eine Vorbehandlung von HBEPs mit IFN- λ eine Auswirkung auf die effiziente LASV-Replikation hat. Differenzierte HBEPs wurden für 16 h mit rekombinantem IFN- λ 2 (IL-28A) stimuliert und anschließend simultan von der apikalen und basolateralen Seite mit LASV infiziert. Nach 48 h wurde die Virusreplikation mittels qPCR analysiert und die Virusfreisetzung über die apikale und basolaterale Seite mittels TCID₅₀ quantifiziert. Wie in Abb. 5.11a gezeigt, führte die Vorbehandlung mit IFN- λ zu einer Hochregulation der antiviralen Genexpression von Mx1, OAS, ISG15, ISG56 und somit zur Etablierung eines antiviralen Status in den HBEPs. Die Vorstimulation mit IFN- λ führte zu einer signifikanten Reduktion der Virusreplikation um bis zu 80% im Vergleich zu der LASV-Replikation in den unbehandelten Kontrollzellen (Abb. 5.11b, linker Graph). Während die Virusfreisetzung über die basolaterale Membran durch die IFN- λ -Vorstimulation nicht beeinträchtigt zu sein scheint, ist die apikale Virusfreisetzung signifikant reduziert (Abb. 5.11b, rechter Graph). Als Nächstes wurde untersucht, ob die verminderte apikale LASV-Freisetzung aus einer veränderten zellulären Lokalisation des LASV GP resultiert. Zu diesem Zweck wurden IFN- λ -stimulierte und unbehandelte HBEPs simultan über die apikale und basolaterale Membran mit LASV infiziert und für 48 h inkubiert. Die virusinfizierten Zellen wurden gegen die Lasaviralen Antigene NP oder GP gefärbt. Um die zelluläre Lokalisation der viralen Proteine im polaren Epithel zu bestimmen, wurden die Zellen parallel mit Phalloidin-TRITC gefärbt. Die Auswertung mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie zeigte, dass die IFN- λ -Vorstimulation keinen Einfluss auf die zelluläre Verteilung von LASV NP und LASV GP hat (Abb. 5.11c). Somit lässt sich die verminderte Virusfreisetzung über die apikale Membranseite nicht auf einen veränderten apikalen Transport des LASV GP zurückführen, sondern vermutlich auf eine inhibierte Virusreplikation.

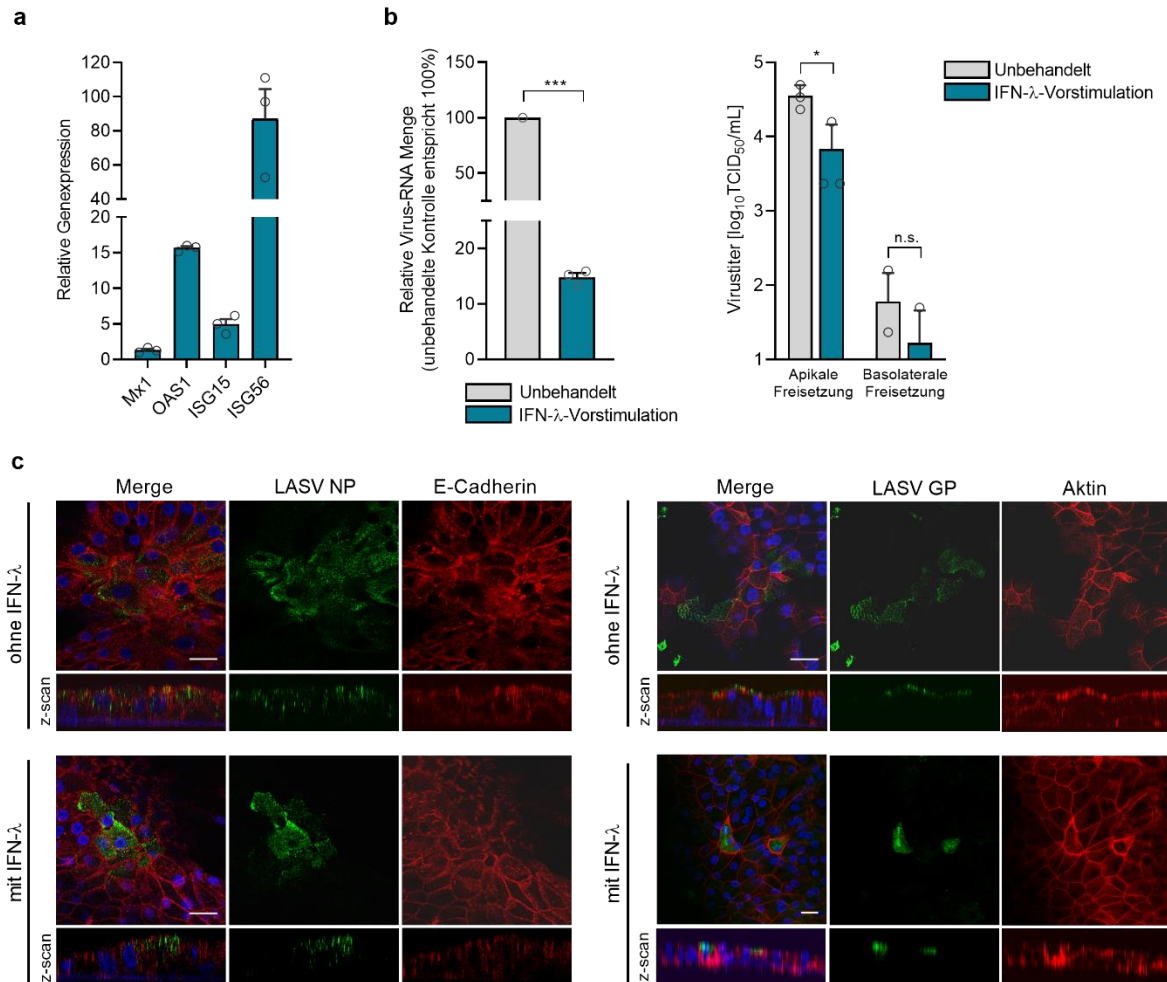


Abb 5.11: LASV-Reduktion bei IFN-λ Stimulation. (a) Differenzierte HBEPcs wurden für 16 h mit humanem IFN-λ2 stimuliert und die ISG-Induktion mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. (b, c) Die stimulierten Zellen wurden simultan über die apikale und basolaterale Seite mit $1,2 \times 10^5$ PFU LASV infiziert. (b) Nach 48 h wurden die Zelllysate geerntet, die RNA isoliert und die virale RNA in der RT-PCR quantifiziert (linker Graph). Die Virustiter aus dem apikalen und basalen Medium wurden mittels TCID₅₀ bestimmt (rechter Graph). Dargestellt sind die Mittelwerte und die SEM von drei biologischen Replikaten. Die statistische Signifikanz wurde mit einem ungepaarten t-Test berechnet (*p= 0,032; ***p< 0,01). (c) Infizierte Zellen wurden nach 48 h mit 4% PFA fixiert und viruspositive Zellen durch die Färbung mit einem anti-LASV-GP Antikörper (37.7H) oder einem Kaninchen anti-LASV NP Antikörper, nachgewiesen. Die Zellgrenzen wurden durch eine Aktin- oder E-Cadherin-Färbung dargestellt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Die Auswertung erfolgte am konfokalen Fluoreszenzmikroskop. Der Maßstabsbalken entspricht 25 μ m.

5.2 VLP-induzierte LASV GP-spezifische Antikörper als potentieller Therapieansatz

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass das LASV humane Atemwegsepithelzellen infizieren und durch die Zerstörung der Epithelintegrität in die Submukosa gelangen kann, was somit zu einer systemischen Ausbreitung führt. Erfolgt der Viruseintritt über eine andere Infektionsroute, kann es nach einer systemischen Streuung zu einer Infektion des respiratorischen Epithels über die basolaterale Membranseite kommen. In beiden Fällen führt die Infektion des respiratorischen Epithels auch zu einer apikalen Virusfreisetzung, die über Tröpfcheninfektion zu einer weiteren Mensch-zu-Mensch Übertragung des LASV beitragen könnte. LASV GP vermittelt die Bindung an den zellulären Rezeptor und somit den Viruseintritt in die Wirtszelle. Daher wurde als Nächstes untersucht, ob LASV GP-spezifische Antikörper, die in hyperimmunisierten Kaninchen generiert wurden, relevante humane Zielzellen vor einer LASV Infektion schützen können und somit einen potenziellen Therapieansatz darstellen. Die Resultate dieser Studie konnten erfolgreich publiziert werden (Müller et al., 2020). Der Schutz vor einer Infektion kann durch neutralisierende Antikörper vermittelt werden, wobei die Neutralisation von LASV auf der Bindung von neutralisierenden Antikörpern an die trimere Struktur des GP auf der Virusoberfläche basiert (Hastie et al., 2017; Robinson et al., 2016).

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die alleinige Expression von LASV GPC in Säugetierzellen zur Freisetzung von GP VLPs führt, bei denen das GP in seiner trimeren Form auf der VLP-Oberfläche exprimiert wird, die der nativen viralen Spike-Struktur von authentischen LASV entspricht (Li et al., 2016; Schlie et al., 2010a; Schlie et al., 2010b). Daher wurde das immunogene Potenzial von LASV GP VLPs untersucht, die die reife und vollständig glykosylierte Form des GP des prototypischen LASV Isolates Josiah auf der Oberfläche tragen (Schematische Darstellung in Abb. 5.12a)

5.2.1 Herstellung von LASV GP VLPs für die Immunisierung von Kaninchen

Um die VLPs in größerem Maßstab herzustellen, wurde eine MDCK II-Zelllinie verwendet, die das LASV GP stabil exprimiert und konstitutiv GP VLPs sezerniert (Schlie et al., 2010a). Die VLPs wurden aus dem Zellkulturüberstand geerntet und mittels Ultrazentrifugation durch ein 20%iges Saccharosekissen aufgereinigt. Wie in Abb. 5.12b dargestellt, konnte die Expression der beiden LASV GP Untereinheiten GP1 und GP2 mit Hilfe von spezifischen Antikörpern im Western Blot bestätigt werden. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen waren pleomorphe Partikel in unterschiedlichen Größen und mit Spike-ähnlichen Strukturen auf ihrer Oberfläche sichtbar (Abb. 5.12c). Um zu untersuchen, ob der Glykosylierungsstatus des rekombinant erzeugten GP der VLPs vergleichbar mit dem GP von infektiösen LASV Partikeln ist, wurde ein Glykosylierungsverdau durchgeführt. Dafür wurden aufgereinigte LASV-Partikel aus infizierten MDCK II-Zellen für den Vergleich herangezogen.

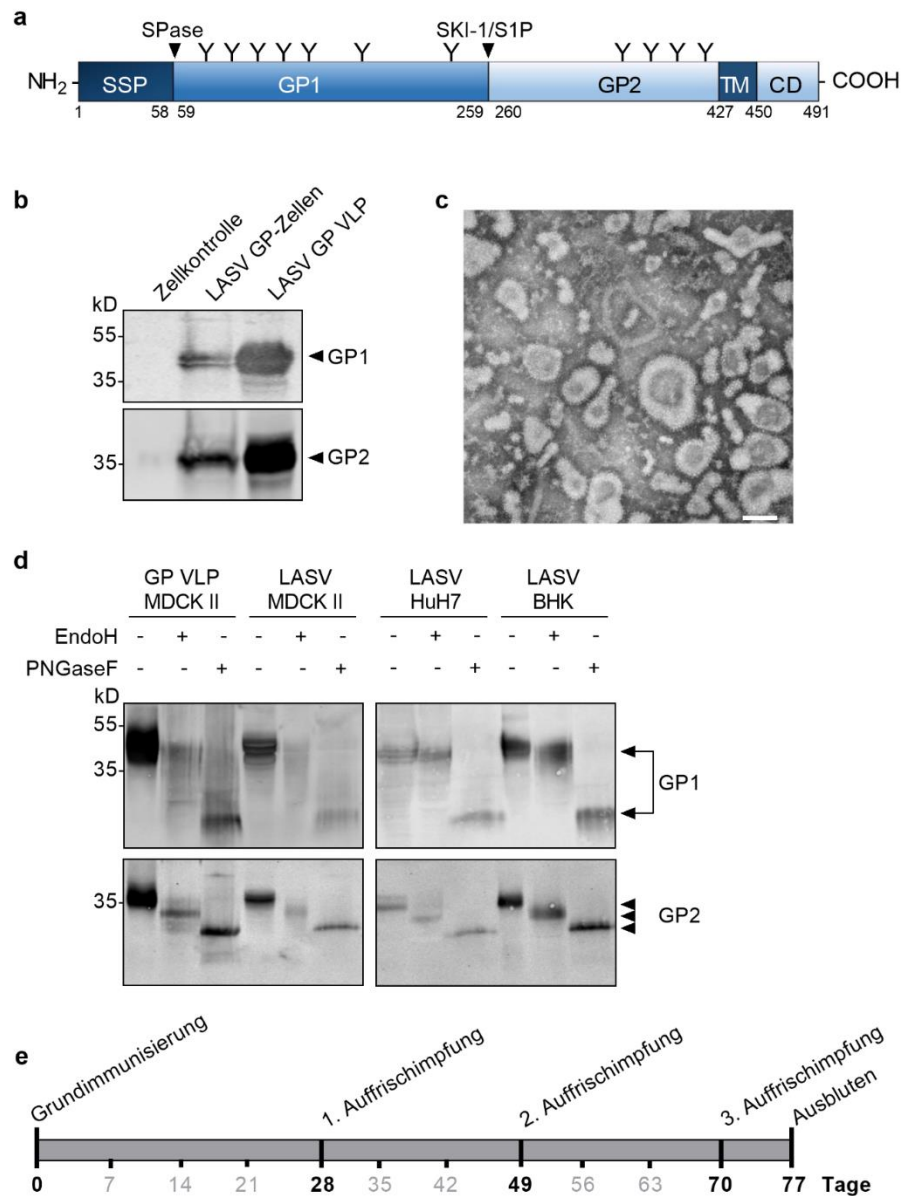


Abb. 5.12: Herstellung von LASV GP VLPs für die Immunisierung. **(a)** Schematische Darstellung von LASV GP, bestehend aus dem stabilen Signalpeptid (SSP), der rezeptorbindenden Untereinheit GP1 und der fusionsvermittelnden Untereinheit GP2, die eine Transmembrandomäne (TM) und eine zytoplasmatische Domäne (CD) enthält. Die Spaltstelle der Signalpeptidase (SPase) (nach Aminosäure 58), die SKI-1/S1P-Spaltstelle (nach Aminosäure 259) und potenzielle Glykosylierungsstellen (Y) sind angegeben. **(b)** LASV GP VLPs wurden aus dem Zellkulturüberstand von MDCK II LASV GP-Zellen aufgereinigt und in SDS-PAGE und Western Blot nachgewiesen. Spezifische Primärantikörper gegen GP1 (Maus anti-AC1) und GP2 (Kaninchen α 4) wurden für den Nachweis verwendet. **(c)** Elektronenmikroskopische Aufnahme von aufgereinigten LASV GP VLPs. Der Maßstabsbalken entspricht 100 nm. **(d)** Endoglykosidischer Verdau von LASV GP VLPs aus dem Überstand von MDCK II LASV GP-Zellen und aufgereinigte LASV Partikel aus dem Überstand von infizierten MDCK II-Zellen, HuH7-Zellen oder BHK-Zellen. Die VLPs und Viren wurden mit Endo β -N-Acetylglucosaminidase H (EndoH) oder N-Glycosidase F (PNGaseF) behandelt. Die GP-Untereinheiten wurden mit primären Antikörpern gegen GP1 (Maus anti-AC1) bzw. GP2 (Kaninchen α 4) nachgewiesen. **(e)** Schematische Darstellung des Immunisierungsprotokolls. Neuseeländische weiße Kaninchen wurden intramuskulär mit 300 μ g VLPs grundimmunisiert und nach 28, 49 und 70 Tagen erneut nachimmunisiert. An Tag 0 und unmittelbar vor jeder Immunisierung wurden Serumproben entnommen. Die letzte Blutentnahme wurde an Tag 77 durchgeführt. Abbildung aus (Müller et al., 2020).

Da es sich bei MDCK II-Zellen um Hundezellen handelt und sie somit keinen typischen Wirtszelltyp für das LASV darstellen, wurde zusätzlich das GP-Glykosylierungsprofil von LASV-Partikeln, die aus infizierten humanen Zellen (HuH7-Zellen) und Nagetierzellen (BHK-Zellen) aufgereinigt wurden, analysiert. Die Auswertung der enzymatischen Deglykosylierung mittels EndoH und PNGaseF zeigt, dass das GP-Glykosylierungsprofil bei den VLPs und authentischem LASV aus MDCK II-Zellen dem GP-Glykosylierungsprofil von LASV-Partikeln entspricht, die aus humanen Zellen und Nagetierzellen freigesetzt werden. LASV GP, welches in unterschiedlichen Zellen exprimiert wurde, war in ähnlicher Weise gegenüber der Endoglykosidase-Behandlung sensitiv und zeigte ein ähnliches Migrationsmuster in der SDS-PAGE-Analyse (Abb. 5.12d).

Für die Immunisierung von Kaninchen (in Zusammenarbeit mit V. von Messling, Paul-Ehrlich-Institut, Langen) wurden die LASV GP VLPs in einem Verhältnis von 1:1 (v/v) mit dem Sigma-Adjuvanz-System gemischt, das die Induktion von funktionellen Antikörpertitern nachweislich verstärkt (Schmidt et al., 2018). Beide Kaninchen (Rb#347 und Rb#350) erhielten nach der primären Immunisierung drei LASV GP VLP-Auffrischungsimpfungen an den Tagen 28, 49 und 70 (Abb. 5.12e). Vor jeder Auffrischungsimpfung wurden Blutproben aus der marginalen Ohrvene entnommen und 77 Tage nach der primären Immunisierung erfolgte bei beiden Tieren die finale Blutung.

5.2.2 Induktion von LASV GP-spezifischen Antikörpern in hyperimmunisierten Kaninchen

Zunächst wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht, ob die Kaninchen 77 Tage nach der Immunisierung LASV GP-spezifische Antikörper gebildet haben. Dafür wurden entweder MDCK II-Zellen, die LASV GP stabil exprimieren, oder Vero E6-Zellen, die GP transient exprimieren, verwendet. Die Präimmunseren (D0) beider Kaninchen dienten als Kontrollen, um eine unspezifische Bindung der polyklonalen Seren auszuschließen. Abbildung 5.13a und b zeigt, dass beide Immunseren (Rb#347_D77 und Rb#350_D77) LASV GP in seiner nativen Konformation in unfixierten MDCK II- und Vero E6-Zellen erkennen. Im Vergleich dazu zeigten die GP-exprimierenden Zellen, die mit den Präimmunseren gefärbt wurden, kein Signal. Da einige serologische Nachweisverfahren eine chemische Fixierung erforderlich machen, wurde als Nächstes untersucht, ob eine Fixierung mit 4%igem PFA aufgrund möglicher PFA-induzierter struktureller Veränderungen und/oder durch Quervernetzung des GP-Antigens, die Antikörperbindung und Antigenerkennung beeinflusst. Die Färbung von PFA-fixierten MDCK II-Zellen, die GP stabil exprimieren, sowie Vero E6-Zellen, die GP transient exprimieren, war bei beiden Immunseren vergleichbar mit dem Färbemuster in unfixierten Zellen (Abb. 5.13a und b). Somit bleiben die Antikörperbindungsstellen innerhalb des LASV GP auch nach einer chemischen Fixierung erhalten.

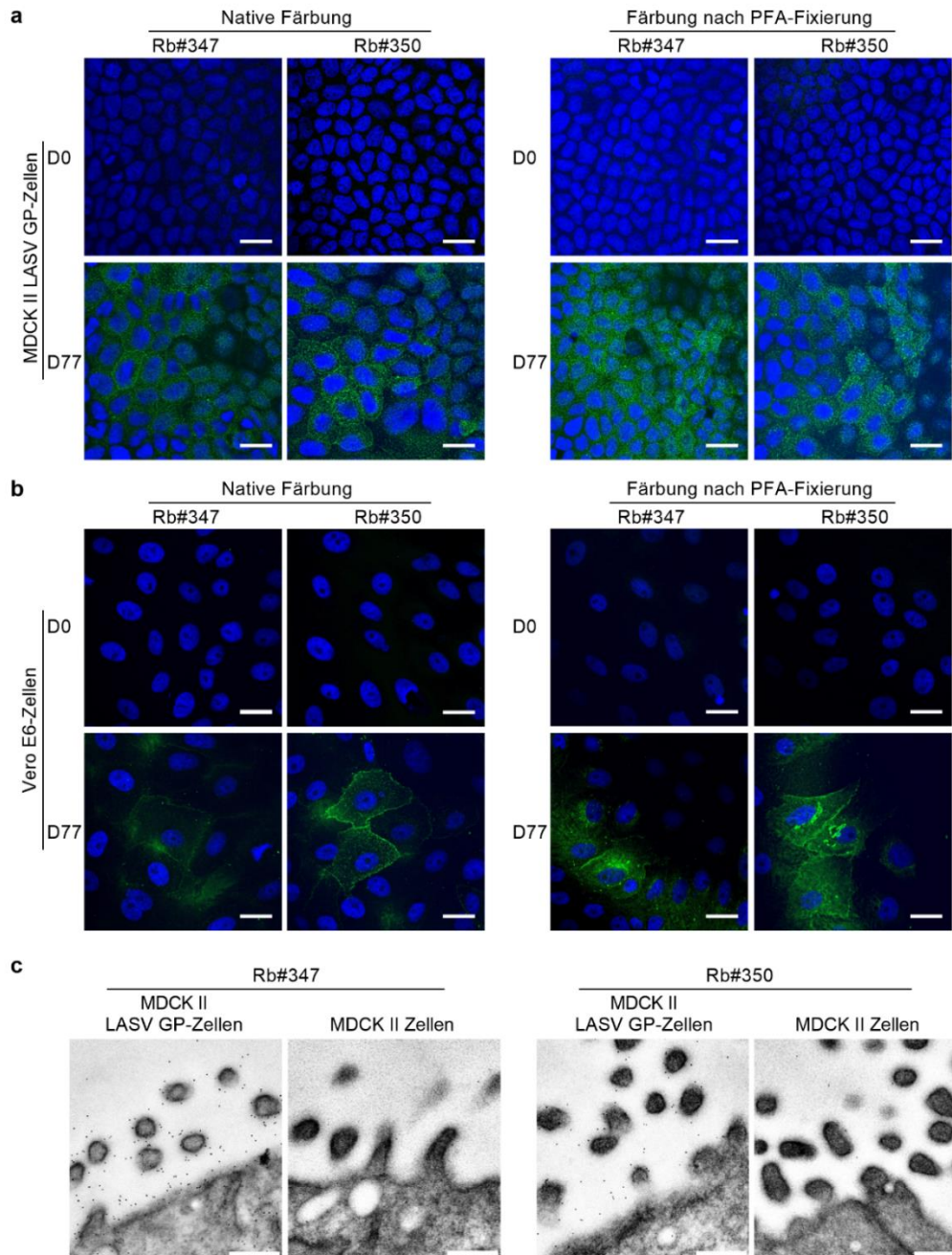


Abb. 5.13: Erkennung von LASV GP durch GP VLP induzierte Antikörper. Immunfluoreszenzmikroskopie von **(a)** LASV GP stabil exprimierenden MDCK II-Zellen oder **(b)** LASV GP transfizierten Vero E6-Zellen. Zur Färbung der nativen Antigene wurden die Zellen vor der Fixierung mit 4% PFA entweder mit den Präimmunseren (D0) oder den Immunseren (D77) inkubiert. Für die Färbung der fixierten Antigene wurden die Zellen mit 4% PFA behandelt, danach permeabilisiert und anschließend mit den entsprechenden Kaninchenseren inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurde der anti-Kaninchen Alexa Fluor 488 verwendet. Die Zellkerne wurden mit DAPI sichtbar gemacht. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μ m. **(c)** Immunelektronenmikroskopie bei stabil transfizierten (MDCK II LASV GP-Zellen) und untransfizierten MDCK II-Zellen. Für die Immungoldfärbung von GP wurden die Zellen mit Aldehyd fixiert, pelletiert und in LR-White Einbettmedium eingebettet. Die Ultradünnschnitte wurden mit den Kaninchenseren (Rb#347_D77 oder Rb#350_D77) und anschließend mit Protein A, das mit 6 nm kolloidalem Gold konjugiert wurde, inkubiert. Der Maßstabsbalken entspricht 250 μ m. Abbildung aus (Müller et al., 2020).

Zur weiteren Bestätigung von LASV GP-spezifischen Antikörpern in den Kaninchenseren Rb#347_D77 und Rb#350_D77 wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt (in Zusammenarbeit mit M. Schaufflinger, Institut für Virologie, Philipps-Universität Marburg). Dafür wurden Ultradünnschnitte von MDCK II LASV GP-Zellen angefertigt und mit den Seren Rb#347_D77 oder Rb#350_D77 sowie Goldpartikel-gekoppelten Sekundäntikörpern gefärbt. Mit beiden Kaninchenseren ließ sich das GP an der Plasmamembran der stabil transfizierten Zellen nachweisen, wohingegen in den untransfizierten MDCK II-Kontrollzellen nur ein schwaches (wenige Goldpartikel) und somit unspezifisches Signal beobachtet werden konnte (Abb. 5.12c).

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die Immunisierung mit nativem LASV GP auf der Oberfläche von VLPs zur Induktion von LASV GP-spezifischen Antikörpern in Kaninchen führt.

5.2.3 Quantifizierung und Charakterisierung von LASV GP-spezifischen Antikörpern

Als Nächstes wurden die LASV GP-spezifischen Antikörper mit Hilfe eines IPMA quantifiziert. Dafür wurden Vero E6-Zellen mit VSVΔG/LASVGP infiziert und nach der Fixierung mit den seriell verdünnten Kaninchenseren gefärbt. Der Titer gibt dabei an, bei welcher Serumverdünnung noch infizierte Zellen nachgewiesen werden können. Der polyklonale Antikörper $\alpha 4$ wurde hierbei als Positivkontrolle verwendet (Lenz et al., 2000). Wie in Abb. 5.14a dargestellt, konnte für das Kaninchenserum Rb#347_D77 ein Antikörpertiter von 1:1.706 bestimmt werden, während für das Kaninchenserum Rb#350_D77 ein achtfach höherer Antikörpertiter von 1:13.653 nachweisbar war. Diese Ergebnisse bestätigen, dass LASV GP VLPs immunogen sind und die Bildung von spezifischen Antikörpern induzieren. Als Nächstes wurde untersucht, gegen welche der beiden LASV GP-Untereinheiten (GP1 und GP2) die induzierten Antikörper gerichtet sind. Dafür wurde ein ELISA mit rekombinantem LASV GP1 (Aminosäurenbereich 59-259) und GP2 (Aminosäurenbereich 260-426) etabliert. Die Reinheit der rekombinanten GP1 und GP2 Proteine wurde durch eine SDS-PAGE mit anschließender Proteingelfärbung bestätigt (Abb. 5.14b). Das höhere Molekulargewicht beider rekombinanten Proteine resultierte aus einem zusätzlichen humanen IgG Fc-Tag und einem Glyzin-Serin-Linker. Als Kontrollen für den GP1- und GP2-spezifischen IgG-ELISA wurden LASV GP-spezifische polyklonale Kaninchenseren mit den Bezeichnungen $\alpha 231$ (erkennt LASV GP1) und $\alpha 3$ (erkennt LASV GP2) verwendet, die bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden waren (Lenz et al., 2000; Strecker et al., 2003). Die Spezifität beider Antiseren wurde zunächst im Western Blot unter Verwendung von LASV GP VLPs als Antigen untersucht (Abb. 5.14c). Die Ergebnisse aus dem ELISA zeigen den spezifischen Nachweis von rekombinantem GP1 und GP2 durch die Kontrollseren $\alpha 231$ bzw. $\alpha 3$ (Abb. 5.14d). Als Negativkontrolle für den ELISA diente ein naives Kaninchenserum. Bei der Untersuchung der Seren der hyperimmunisierten Kaninchen zeigte sich, dass das Kaninchen Rb#347 signifikant mehr GP2-spezifische Antikörper gebildet hat als GP1-spezifische Antikörper. Im Vergleich dazu wurden bei dem Kaninchen Rb#350 signifikant mehr GP1-spezifische Antikörper induziert als GP2-spezifische

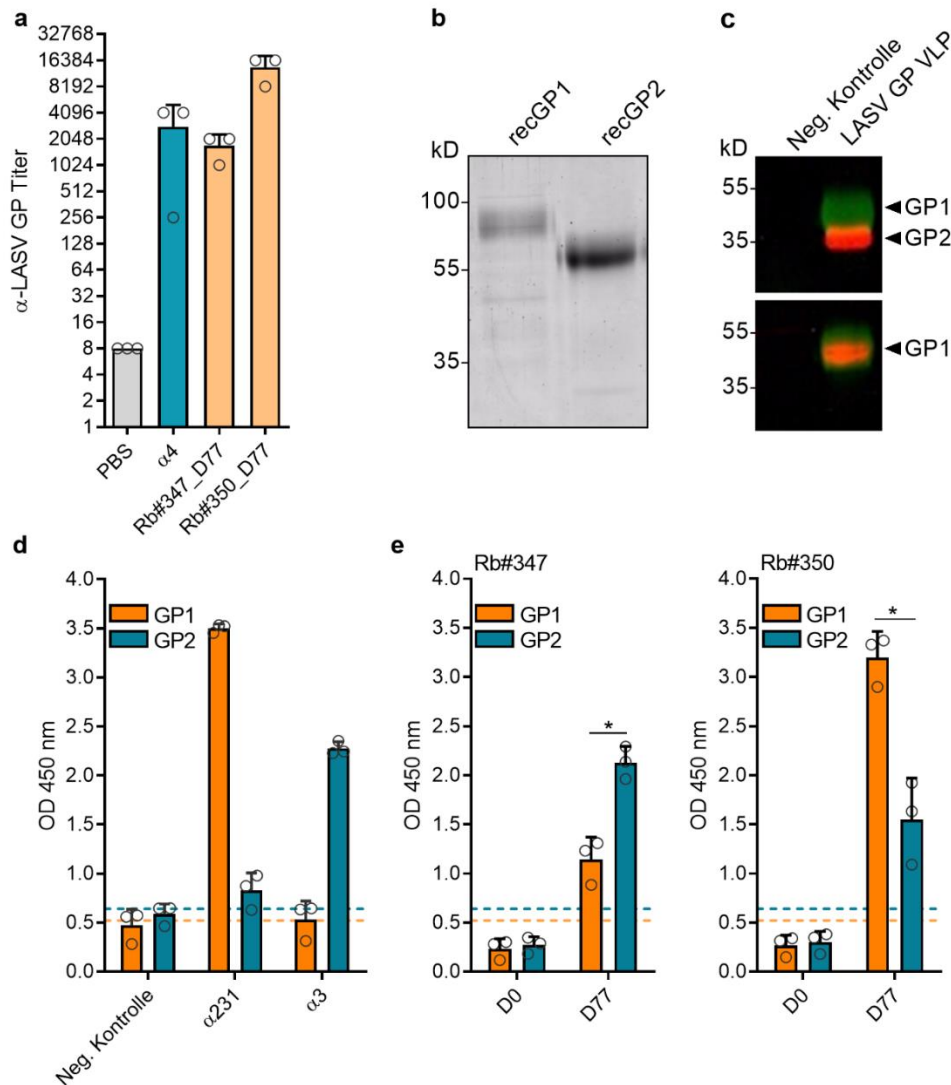


Abb. 5.14: Quantifizierung von LASV GP-spezifischen Antikörpern. (a) Die anti-LASV GP Antikörpertiter wurden mittels IPMA bestimmt. Die Titer der Kaninchenserum Rb#347 und Rb#350 nach der finalen Blutung (D77) und des Kontrollantikörpers (α4) sind dargestellt. Die initiale Verdünnung betrug 1:16 und der Gesamtiter von anti-LASV GP wurde als Kehrwert der letzten Serumverdünnung berechnet, bei der noch eine positive Färbung nachweisbar war. Gezeigt sind die Mittelwerte und die SD von drei unabhängigen Experimenten. (b) SDS-PAGE und Proteingelfärbung der rekombinanten LASV GP1- und GP2-Proteine. Die entsprechenden Molekülmassen sind angegeben. (c) Western Blot-Analyse zum Nachweis von LASV GP1- und GP2-spezifischen Kontrollseren (α231 und α3). GP VLPs und ein Kontroll-Zellkulturüberstand wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen übertragen. Der obere Blot wurde mit dem Maus anti-AC1 Antikörper (gegen GP1) und dem Kaninchen α3 Antikörper (gegen GP2) angefärbt. Der untere Blot wurde mit dem Mausantikörper AC1 und dem Kaninchen α231 Antikörper (gegen GP1) angefärbt. (d) ELISA zum Nachweis der LASV GP1- und GP2-spezifischen Kontrollseren α231 und α3, sowie einem negativen Kontrollserum. (e) ELISA zur Bestimmung der Konzentration von GP1- und GP2-spezifischen Antikörpern in Präimmunseren (D0) und Immunseren (D77). Dargestellt sind die Mittelwerte der OD 450 nm-Werte und die SD aus drei unabhängigen Experimenten. Die gestrichelte Linie gibt die Nachweisgrenze an und wurde aus dem Mittelwert der negativen Kontrolle + 10% berechnet. Die statistische Signifikanz wurde mit einem ungepaarten t-Test (*p-Wert < 0,05) berechnet. Abbildung aus (Müller et al., 2020).

Antikörper (Abb. 5.14e). Bei der Messung der beiden Präimmunseren (D0) wurden hingegen keine GP-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Diese Daten zeigen, dass die Adjuvanz-verstärkte Immunisierung mit LASV GP VLPs zur Induktion von spezifischen Antikörpern führt, die gegen beide LASV GP-Untereinheiten gerichtet sind.

5.2.4 Kreuzreaktivität bei LASV GP VLP-induzierten Antikörpern

Für die Generierung der LASV GP VLPs wurde das GP der LASV-Linie IV (Isolat Josiah) verwendet. Als Nächstes wurde daher untersucht, ob die LASV GP VLP-induzierten polyklonalen Antikörper kreuzreaktiv sind und das GP von anderen LASV-Linien sowie dem verwandten Altwelt-Mammarenavirus Lymphozytäres Choriomeningitisvirus (LCMV) erkennen. Dafür wurden die GPs der LASV-Linien I, II, IV, V und VII sowie LCMV in Vero E6-Zellen transient exprimiert. Anschließend wurden die Zellen mit den Kaninchenseren gefärbt und mittels Immunfluoreszenzmikroskopie ausgewertet (Abb. 5.15). Als Positivkontrolle diente der kreuzreaktive humane monoklonale Antikörper 37.7H (Robinson et al., 2016). Neben dem GP der LASV-Linie IV erkannten beide Kaninchenseren das GP aller anderen getesteten LASV-Linien sowie das GP von LCMV. Somit weisen die durch LASV Josiah GP-induzierten Antikörper kreuzreaktive Bindungseigenschaften auf. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit früheren Studien, in denen eine Kreuzreaktivität von humanen monoklonalen LASV GP-spezifischen Antikörpern gezeigt wurde (Robinson et al., 2016).

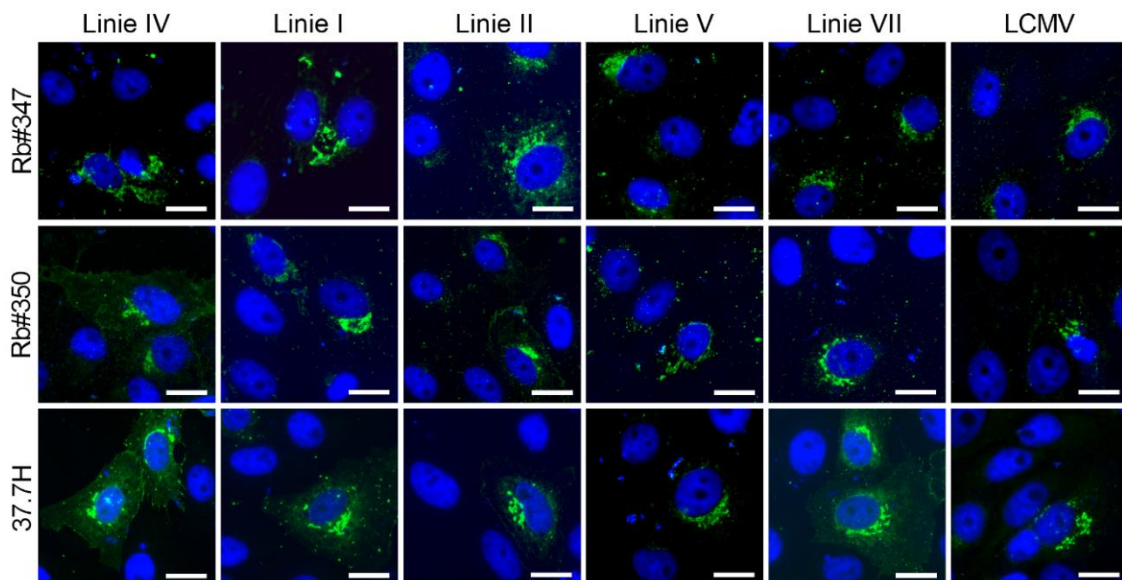


Abb. 5.15: Kreuzreaktivität der Kaninchenseren gegen das GP von fünf LASV Linien und LCMV GP. Vero E6-Zellen wurden mit GP der LASV-Linien I, II, IV, V und VII oder LCMV transfiziert. Nach 24 h, wurden die Zellen fixiert, mit den Kaninchenseren Rb#347_D77, Rb#350_D77 oder dem Antikörper 37.7H inkubiert und mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI sichtbar gemacht. Die Überlagerung der einzelnen Farbkanäle ist dargestellt. Der Maßstabsbalken entspricht 20 µm. Abbildung aus (Müller et al., 2020).

5.2.5 LASV GP VLP-induzierte Bildung von neutralisierenden Antikörpern

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die polyklonalen kreuzreaktiven Antikörper auch neutralisierende Eigenschaften besitzen und eine LASV-Infektion *in vitro* hemmen können. Dafür wurden die Neutralisationstiter in einem Immunfokus-Reduktionsneutralisationstest mit authentischen LASV bestimmt (in Zusammenarbeit mit L. Oestereich, Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg). In den Infektionsstudien mit LASV Josiah konnten für die Seren Rb#347_D77 und Rb#350_D77 hohe Neutralisationstiter (mit IC_{50} -Werten von 1:354 bzw. 1:449) detektiert werden (Abb. 5.16a). Darüber hinaus konnten beide Kaninchenseren ein klinisches LASV-Isolat der Linie II (Kafetzopoulou et al., 2019) neutralisieren, wenn auch zu geringeren Titern (mit IC_{50} -Werten von 1:210 bzw. 1:350). Diese Ergebnisse deuten auf eine kreuzneutralisierende Aktivität der polyklonalen Antikörper hin. Der humane monoklonale Antikörper 37.7H diente als Positivkontrolle. Die beiden Negativkontrollseren aus dem Kaninchen und dem Menschen zeigten bei beiden getesteten Viren keine neutralisierende Aktivität. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Immunisierung mit LASV GP VLPs zur Induktion von neutralisierenden Antikörpern führt (Müller et al., 2020).

5.2.6 Induktion von kreuzneutralisierenden LASV GP-spezifischen Antikörpern

Da die Kaninchenseren LASV der Linie II neutralisierten, wurde als Nächstes in einem LASV-Pseudovirus-basierten Neutralisationstest untersucht, ob auch weitere LASV Linien neutralisiert werden können (in Zusammenarbeit mit R. A. Urbanowicz, *Wolfson Centre for Global Virus Infections*, Universität Nottingham, Großbritannien). Hierzu wurde ein retrovirales Pseudovirus-Surrogatmodell verwendet, bei dem die Pseudoviren auf ihrer Oberfläche das LASV GP verschiedener Linien tragen (Urbanowicz et al., 2016). Als Negativkontrolle wurde das Glykoprotein (G) des VSV eingesetzt. Wie in Abb. 5.16b gezeigt, konnten beide getesteten Kaninchenseren alle fünf LASV-Linien neutralisieren und zeigten keine unspezifische Neutralisation gegenüber VSV G-exprimierenden Pseudoviren. Überraschenderweise waren die Neutralisationstiter (hier 50% der Infektionsdosis, engl. *infection dose*, ID) beider Kaninchenseren für Linie I am höchsten (Rb#347, ID_{50} -Wert von 1:130; Rb#350, ID_{50} -Wert von 1:1.507) und nicht für den Virusstamm Josiah (Linie IV), gegen dessen GP die Antikörper gebildet wurden. Die geringsten Neutralisationstiter ließen sich für Linie V beobachten (Rb#347, ID_{50} -Wert von 1:25; Rb#350, ID_{50} -Wert von 1:373). Wie bereits im Neutralisationstest mit authentischem LASV beobachtet wurde, ließen sich auch hier höhere Neutralisationstiter für das Serum Rb#350 im Vergleich zum Serum Rb#347 nachweisen. Der kreuzreaktive monoklonale humane Antikörper 37.7H wurde als Positivkontrolle verwendet und war in der Lage die LASV-Linien II und IV, und zu einem geringeren Titer auch Linie I, zu neutralisieren (Abb. 5.16c). Im Gegensatz zu veröffentlichten Daten (Robinson et al., 2016), konnte der 37.7H Antikörper das GP der Linie III nicht neutralisieren. Die Unterschiede in den Neutralisationstitern könnte an den unterschiedlichen Pseudovirus-Plattformen liegen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Immunisierung mit LASV GP VLPs, die Bildung von

kreuzreaktiven Antikörpern induziert, die in der Lage sind fünf verschiedene LASV-Linien zu neutralisieren (Müller et al., 2020).

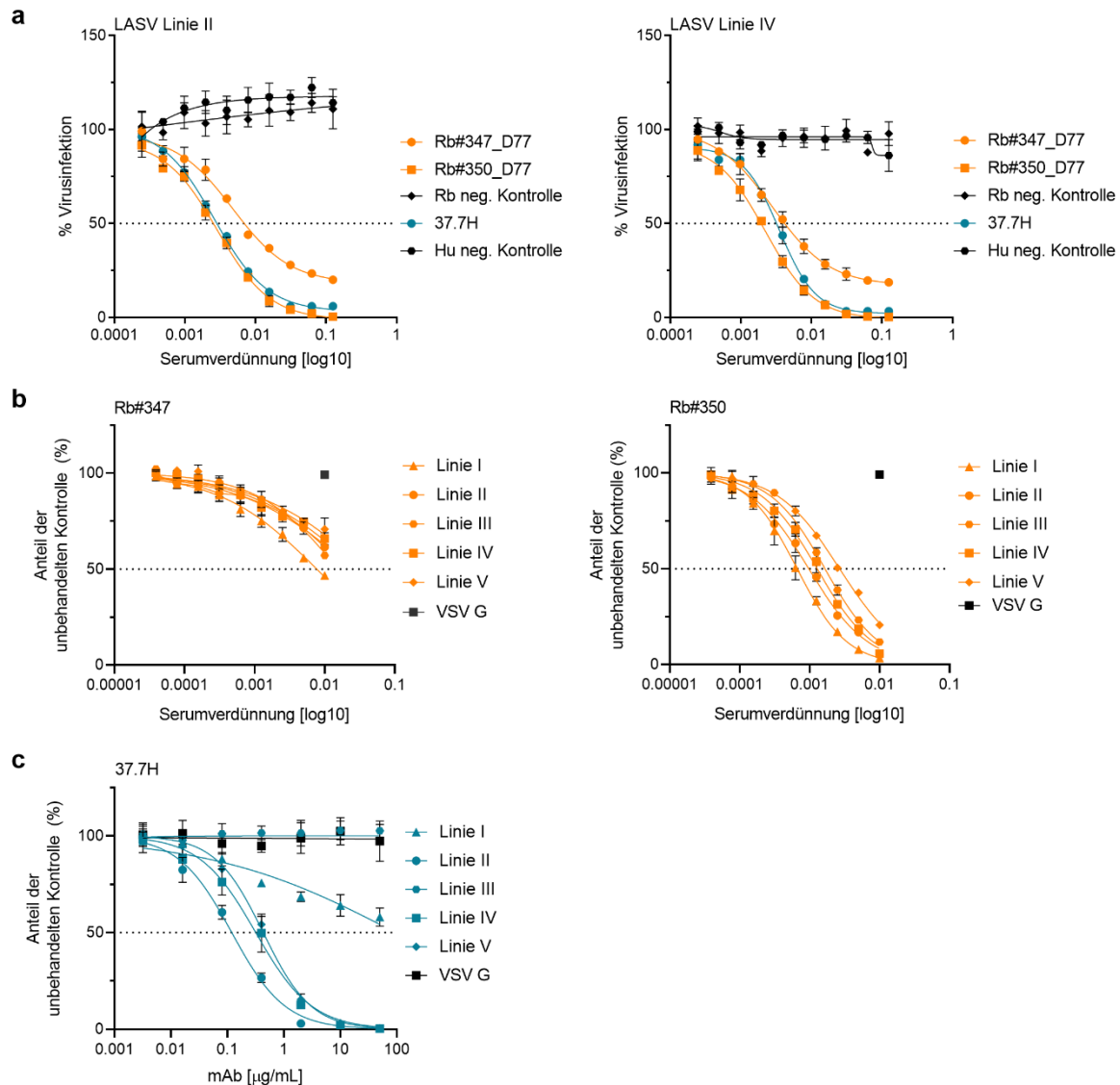


Abb. 5.16: Nachweis von LASV GP VLP-induzierten kreuzneutralisierenden Antikörpern. Serielle Verdünnungen der Kaninchenserum von Tag 77, sowie der 37.7H Kontrollantikörper wurden mit **(a)** authentischen LASV der Linien II und IV oder **(b, c)** retroviralen LASV-Pseudoviren der Linien I, II, III, IV. inkubiert und die Neutralisationstiter bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte und die SD der (a) IC_{50} Werte, bzw. der (b) ID_{50} Werte. Abbildung aus Müller et al., 2020.

5.2.7 Vergleich der neutralisierenden Aktivität von LASV GP VLP-induzierten Antikörpern

Unter Verwendung des replikationskompetenten Surrogatsystems VSVΔG/LASVGP (Garbutt et al., 2004) wurden im Folgenden die Neutralisationstiter der Hyperimmunseren mit humanen Proben verglichen. Wie in Abb. 5.17a gezeigt, ließ sich bei beiden D77-Seren eine hohe neutralisierende Aktivität für VSVΔG/LASVGP beobachten, mit Neutralisationstitern von 1:768 für Rb#347 und 1:2.048 für Rb#350. Im Vergleich dazu konnte für die Präimmunseren (D0) keine Neutralisation beobachtet werden.

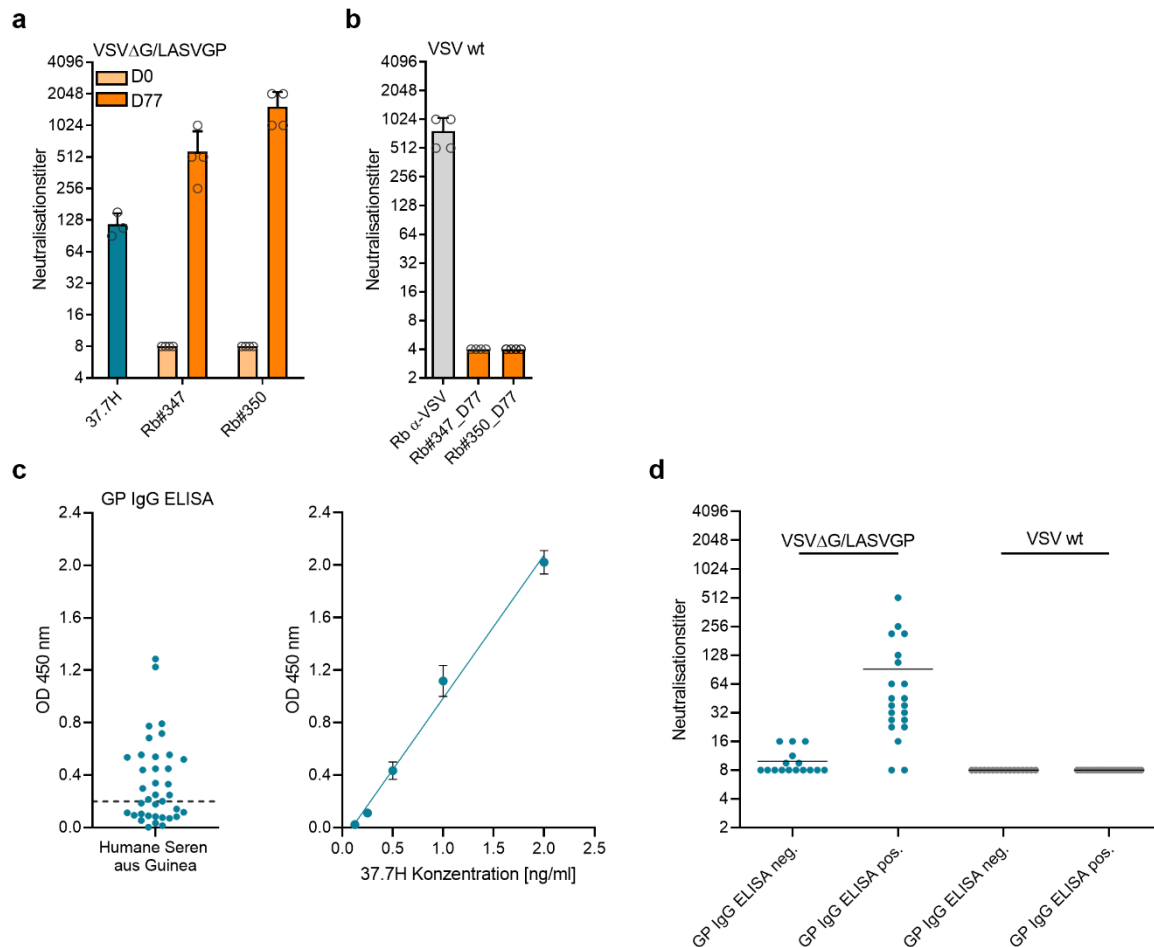


Abb. 5.17: Nachweis von neutralisierenden Antikörpern in Hyperimmunseren und humanen Rekonvaleszenten-seren. **(a)** Serielle Verdünnungen der Kaninchenserum von Tag 0 und 77, sowie der 37.7H Kontrollantikörper wurden mit VSVΔG/LASVGP inkubiert und die Neutralisationstiter als GMT bestimmt. Die Grafiken stellen die Mittelwerte und die SD aus drei unabhängigen Experimenten dar. **(b)** Neutralisationstest mit VSV und den Kaninchenserum von Tag 77. Als Positivkontrolle wurde ein polyklonales anti-VSV Serum verwendet. **(c)** LASV GP IgG-ELISA zum Nachweis von LASV GP-spezifischen Antikörpern in humanen Seren aus einem LASV-Endemiegebiet in Guinea. Die Seren wurden 1:200 verdünnt und in einer Doppelbestimmung gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte der OD 450 nm-Werte. Die gestrichelte Linie gibt die Nachweisgrenze für eine positive Antikörperreaktion an, berechnet als Mittelwert von humanen Negativseren, addiert mit der 2-fachen SD. Für die Vergleichbarkeit aller Messreihen diente eine Standardreihe mit dem humanen monoklonalen Antikörper 37.7H. Dargestellt sind die Mittelwerte und die SD aus vier unabhängigen Messreihen. **(d)** Neutralisationstest mit VSVΔG/LASVGP und humanen Seren. Als Kontrolle wurden Neutralisationstests mit VSV durchgeführt. Die Virusneutralisationstiter sind als GMT dargestellt. Abbildung aus (Müller et al., 2020).

Da die geringste getestete Verdünnung 1:16 betrug, wurde der negative Neutralisationstiter mit 1:8 angegeben. Als Positivkontrolle wurde hier ebenfalls der monoklonale Antikörper 37.7H mitgeführt, der einen durchschnittlichen Neutralisationstiter von 1:117 aufwies. Beide Kaninchenserum zeigten keine Neutralisation von VSV, was darauf hindeutet, dass die neutralisierende Aktivität spezifisch gegen LASV GP gerichtet ist (Abb. 5.17b). Als Kontrolle für eine effiziente Neutralisation von VSV wurde

ein polyklonales anti-VSV Meerschweinchenserum mitgeführt. Für die Vergleichsstudie mit humanen Rekonvaleszentenseren wurden Serumproben herangezogen, die im Rahmen epidemiologischer Untersuchungen in einem LASV-Endemiegebiet in Guinea erfasst wurden (Fichet-Calvet und Magassouba, unveröffentlichte Daten). Zunächst wurde die Menge an LASV GP-spezifischen IgG-Antikörpern in einem LASV GP-ELISA ermittelt (Abb. 5.17c). Dabei konnten in 21 der 37 getesteten humanen Serumproben LASV GP-spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Dahingegen waren 16 Serumproben LASV GP-seronegativ. Anschließend wurden die humanen Seren im Neutralisationstest mit VSVΔG/LASVGP untersucht und die Mittelwerte für die seropositiven und die seronegativen Proben berechnet. Der durchschnittliche Neutralisationstiter für die seronegativen Proben lag bei 1:10, die seropositiven Proben wiesen einen durchschnittlichen Neutralisationstiter von 1:92 auf (Abb. 5.17d). Bei dem Neutralisationstest mit wildtypischem VSV zur Kontrolle konnten keine neutralisierenden Antikörper gegenüber dem VSV G nachgewiesen werden.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Immunisierung mit LASV GP VLPs die Bildung von GP-spezifischen Antikörpern induziert, die im Vergleich zu humanen Rekonvaleszentenseren eine höhere Neutralisationsaktivität aufweisen.

5.2.8 Mehrmalige VLP-Immunisierung ist für eine robuste Antikörperantwort erforderlich

Als Nächstes wurde untersucht, nach wie vielen Tagen nach der erstmaligen Immunisierung die Bildung von neutralisierenden Antikörpern in den hyperimmunisierten Kaninchen eingesetzt hat. Dafür wurden die Neutralisationstiter der Kaninchenseren aus den verschiedenen Abnahmezeitpunkten (Tag 0, Tag 28, Tag 49, Tag 70 und Tag 77) bestimmt. Beide Tiere entwickelten bereits vier Wochen nach der initialen Immunisierung geringe Mengen an neutralisierenden Antikörpern. Jedoch ist für eine effiziente Induktion von neutralisierenden Antikörpern eine mehrmalige Immunisierung mit LASV GP VLPs erforderlich (Abb. 5.18a). Die Zunahme an neutralisierenden Antikörper korrelierte dabei mit Ergebnissen des parallel durchgeführten IgG-ELISA, bei dem ebenfalls ein Anstieg der GP-spezifischen Antikörper im Verlauf der Immunisierung beobachtet wurde (Abb. 5.18b). Zusätzlich wurden die Seren aller Abnahmezeitpunkte in der Immunfluoreszenzmikroskopie in Hinblick auf die Erkennung von GP auf der Zelloberfläche von LASV GP stabil exprimierenden MDCK II-Zellen untersucht. Alle Kaninchenseren aus den unterschiedlichen Entnahmezeitpunkten wiesen eine spezifische GP-Färbung auf. Als Positivkontrollen dienten die polyklonalen Kaninchenseren $\alpha 231$ und $\alpha 3$. Als Negativkontrolle diente ein negatives Kaninchenserum bzw. die beiden Präimmunseren der immunisierten Tiere (Abb. 5.18c). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus dem Neutralisationstest und dem ELISA konnten in allen getesteten Seren nach Immunisierung LASV GP-spezifische Antikörper nachgewiesen werden.

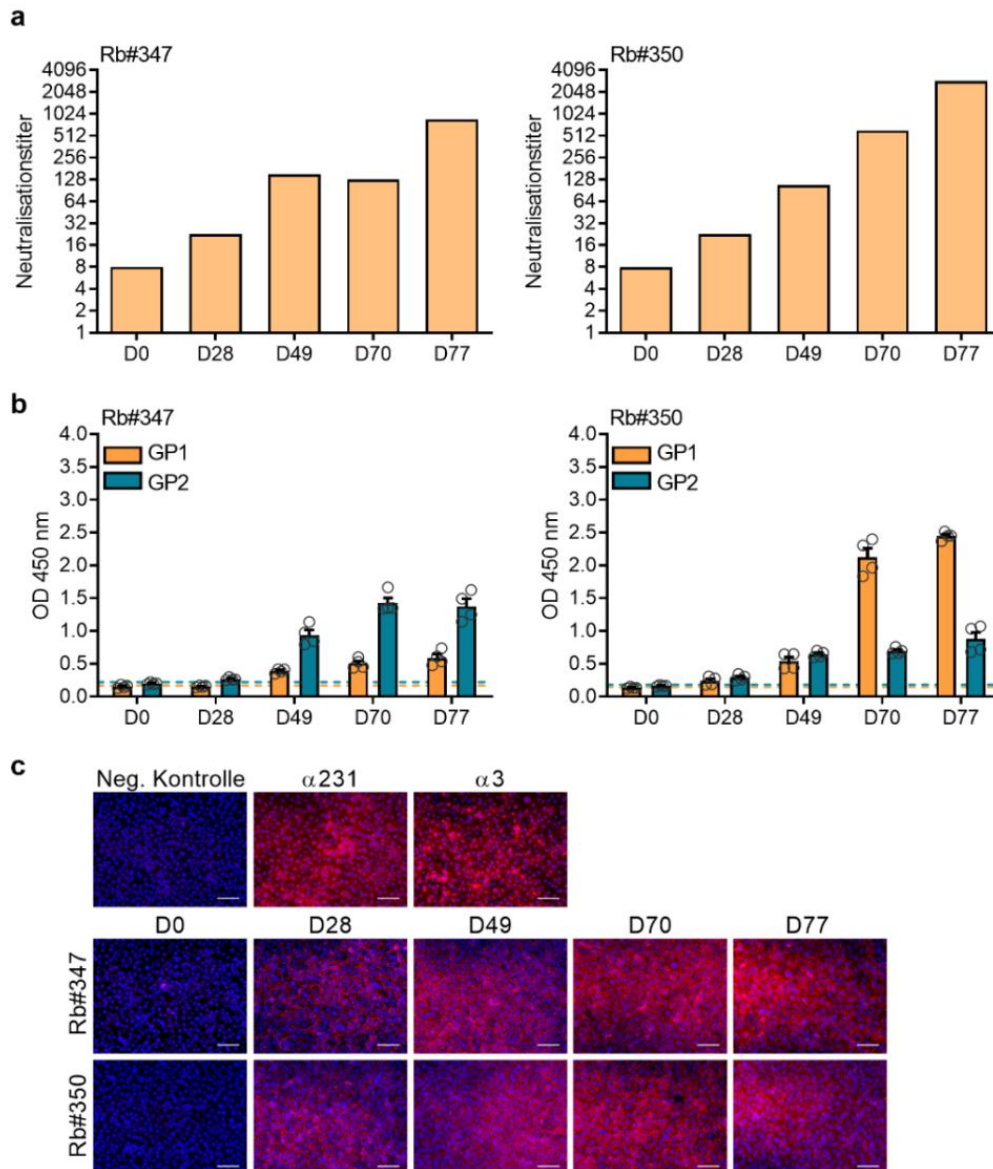


Abb. 5.18: Die Induktion von neutralisierenden Antikörpern erfordert eine mehrmalige LASV GP VLP-Immunisierung. (a) Virusneutralisationstest mit VSVΔG/LASVGP. Dargestellt sind die GMT der Neutralisationstiter der Kaninchenserum von Tag 0, 28, 49, 70 und 77 (n=1). Die anfängliche Serumverdünnung betrug 1:16 und wurde bei negativem Titer als acht angegeben. (b) IgG-ELISA zum Nachweis von LASV GP1- und GP2-spezifischen Antikörpern. Die Kaninchenserum der angegebenen Zeitpunkte wurden 1:200 verdünnt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die SD der OD 450 nm Werte aus der Doppelbestimmung von zwei unabhängigen Experimenten. Die gestrichelte Linie gibt die Nachweisgrenze für einen positiven Antikörpernachweis an und wurde aus dem Mittelwert der Präimmunserum (D0) + 10% bestimmt. (c) Stabil transfizierte MDCK II LASV GP-Zellen wurden mit den Kaninchenserum (1:200) der jeweiligen Abnahmezeitpunkte inkubiert und mittels Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Ein naüves Kaninchenserum diente als Negativkontrolle und die Seren $\alpha 231$ und $\alpha 3$ als Positivkontrolle. Der Anti-Kaninchen Alexa Fluor 568 Antikörper wurde als Sekundärantikörper eingesetzt. Die Zellkerne wurden mit DAPI sichtbar gemacht. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop. Der Maßstabsbalken entspricht 200 μ m. Abbildung aus (Müller et al., 2020).

5.2.9 Neutralisationsmechanismus der LASV GP VLP-induzierten Antikörper

Neutralisierende Antikörper können eine Virusinfektion durch unterschiedliche Mechanismen hemmen. Zum einen können sie die direkte Bindung des Virus an den zellulären Rezeptor verhindern, oder alternativ, die Internalisierung sowie die Virusfusion während des Viruseintritts in die Zelle hemmen. Daher wurde als Nächstes untersucht, bei welchem Schritt die LASV GP VLP-induzierten neutralisierenden Antikörper den Viruseintritt blockieren. Dafür wurden die Seren Rb#347_D77 und Rb#350_D77 seriell verdünnt und entweder vor oder nach der Virusbindung von VSVΔG/LASVGP an Vero E6-Zellen inkubiert. Die Infektion wurde im Anschluss mittels SDS-PAGE und Western Blot-Analyse untersucht. Im oberen Blot von Abb. 5.19a und b sind die Ergebnisse mit den vorinkubierten VSVΔG/LASVGP-Antikörper-Ansätzen dargestellt. Beide Kaninchenserum zeigten hier eine dosisabhängige Neutralisation der VSVΔG/LASVGP-Infektion. Für die Untersuchung einer möglichen Neutralisation nach der Virusbindung wurden die Zellen zuerst mit VSVΔG/LASVGP für 1 h bei 4°C inkubiert, sodass die Viren an den zellulären Rezeptor binden konnten, jedoch nicht internalisiert wurden. Anschließend wurden die seriell verdünnten Kaninchenserum auf die Zellen gegeben. Für das Kaninchenserum Rb#350_D77 ließ sich auch nach der Virusbindung eine dosisabhängige Neutralisation beobachten, jedoch nicht für Rb#347_D77 (Abb. 5.19a und b, unterer Blot). Dies deutet darauf hin, dass zumindest ein Teil der neutralisierenden Antikörper aus dem polyklonalen Kaninchenserum Rb#350_D77 zusätzlich zur Virusbindung an den zellulären Rezeptor, den Viruseintritt während der endozytotischen Internalisierung und/oder die GP-vermittelte Virusfusion hemmen.

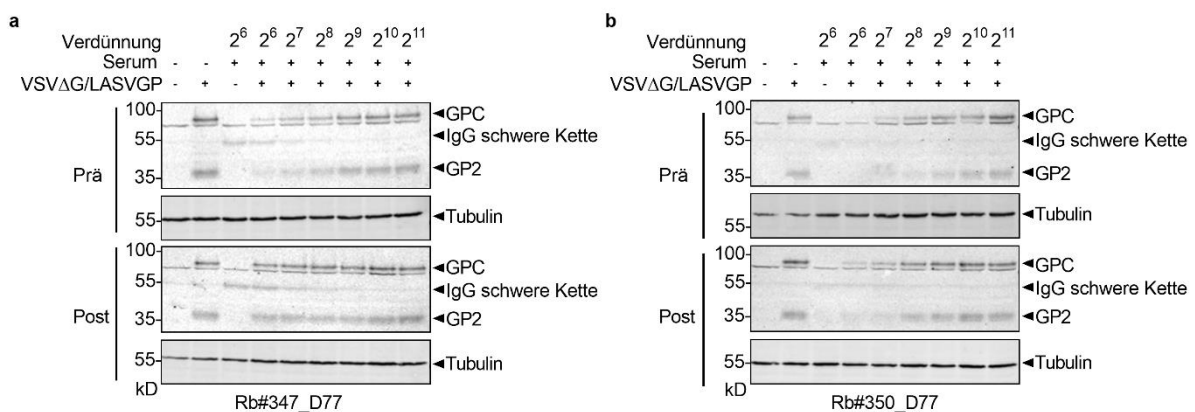


Abb. 5.19: Mechanismus der LASV-Neutralisation. Virusneutralisationstests mit VSVΔG/LASVGP vor und nach der Virusbindung an den zellulären Rezeptor. Dargestellt sind die Ergebnisse für das Kaninchenserum Rb#347_D77 (**a**) und Rb#350_D77 (**b**). Beide Seren wurden seriell verdünnt und mit VSVΔG/LASVGP entweder vor der Virusanheftung (Prä) oder nach der Virusanheftung (Post) an die Zelloberfläche inkubiert. Die Zelllysate wurden 24 h nach der Infektion geerntet und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. LASV GPC und GP2 wurden mit dem Kaninchenserum α4 und einem anti-Kaninchen Alexa Fluor 680 als Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Die Detektion von Tubulin diente als Ladekontrolle. Abbildung aus (Müller et al., 2020).

5.2.10 Aufgereinigte IgG Antikörper zeigen eine erhöhte neutralisierende Aktivität

Als Nächstes wurden die IgG-Antikörper aus den Kaninchenseren über eine Protein A-Affinitätssäule aufgereinigt und die Menge der LASV GP-spezifischen Antikörper sowie die Virusneutralisationstiter bestimmt. Um zu untersuchen, ob die Antikörperaufreinigung erfolgreich war und alle Serumproteine entfernt wurden, wurde eine SDS-PAGE mit einer anschließenden Proteingelfärbung durchgeführt. In Abb. 5.20a ist für beide Seren zu erkennen, dass nach der Aufreinigung nur die schweren und leichten Ketten der IgG-Antikörper nachweisbar sind. Die Proteinkonzentration betrug 1,23 mg/ml für die IgG Präparation Rb#347_D77+ und 7,91 mg/ml für Rb#350_D77+. Um zu untersuchen, ob die funktionellen Eigenschaften nach der IgG-Aufreinigung erhalten blieben, wurden die Neutralisationstiter mit dem VSVΔG/LASVGP-Virusneutralisationstest bestimmt.

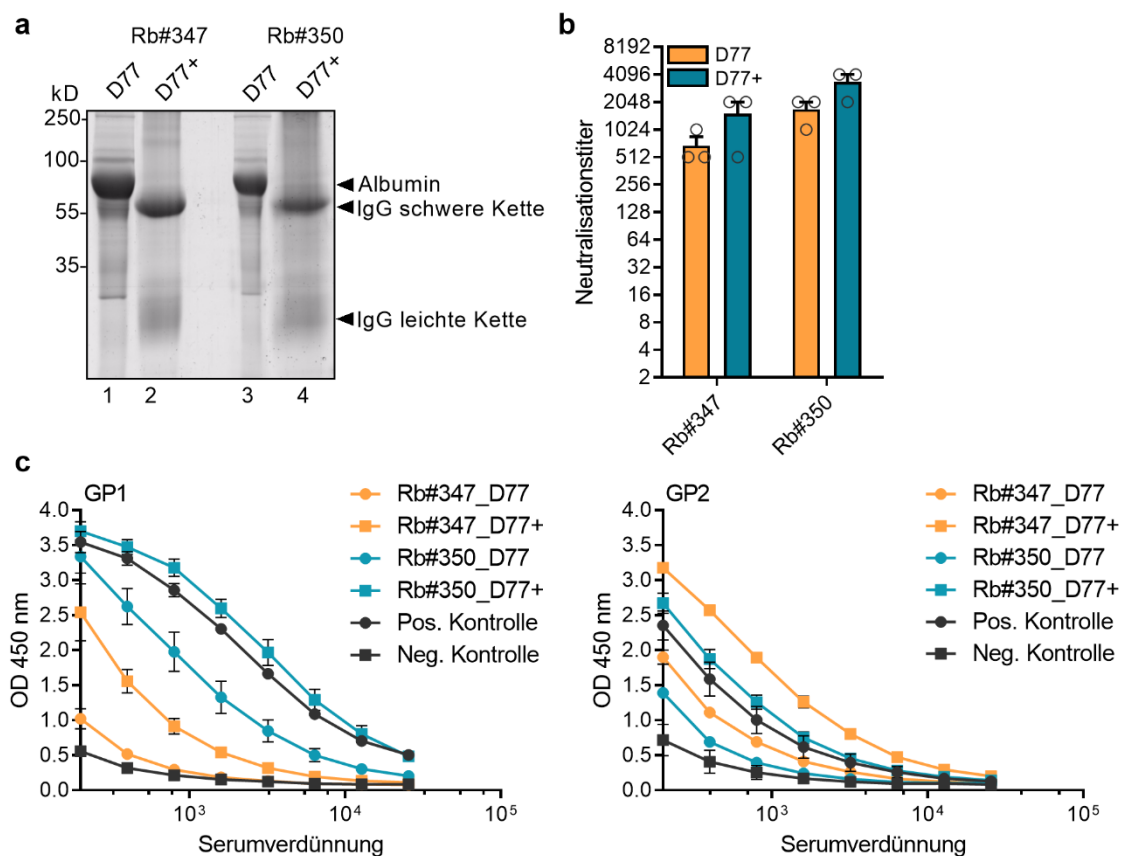


Abb. 5.20: IgG-Antikörper Aufreinigung und Charakterisierung. Die IgG-Antikörper aus den Kaninchenseren Rb#347_D77 und Rb#350_D77 wurden über eine Protein A-Affinitätssäule aufgereinigt und angereichert. **(a)** Für die Untersuchung der Reinheit der IgG-Präparationen wurden 3 µg der Gesamtproteinmenge mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Proteingel angefärbt. Die Proben 1 und 3 sind die Kaninchenseren vor der Aufreinigung. Die Proben 2 und 4 sind Elutionen nach der Affinitätsreinigung. **(b)** Virusneutralisationstest mit VSVΔG/LASVGP und den Kaninchenseren vor (D77) und nach (D77+) der Affinitätsreinigung. Dargestellt sind die Mittelwerte und die SD der GMT-Werte von drei unabhängigen Experimenten **(c)** Nachweis von LASV GP1- und GP2-spezifischen Antikörpern mittels ELISA. Dargestellt sind die Mittelwerte der OD 450 nm Werte der reziproken Serumverdünnungen und die SD von drei unabhängigen Experimenten. Abbildung aus (Müller et al., 2020).

Die mittleren Neutralisationstiter beider IgG-Präparationen lagen im Bereich von 1:1.280 bis 1:3.072 und waren damit im Vergleich zu den Titern der unbehandelten Kaninchenserum erhöht (Abb. 5.20b). In Übereinstimmung mit der erhöhten neutralisierenden Aktivität ließen sich auch im IgG-ELISA höhere Konzentrationen von LASV GP1- und GP2-spezifischen Antikörpern im Vergleich zu den nicht aufgereinigten Seren nachweisen (Abb. 5.20c).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die neutralisierenden Eigenschaften der LASV GP-spezifischen Antikörper nach der Protein A-Affinitätsreinigung erhalten blieben.

5.2.11 VLP-induzierte Antikörper hemmen eine LASV-Infektion von humanen Zielzellen

Das LASV kann sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, verschiedene humane Zelltypen infizieren. Dazu zählen beispielsweise von Monozyten abstammende Makrophagen und dendritische Zellen sowie Leber- und Atemwegsepithelzellen. Dieser breite Wirtszelltropismus wird vermutlich durch die Bindung an unterschiedliche zelluläre Rezeptoren ermöglicht (Cao et al., 1998; Shimojima et al., 2012). Als Nächstes wurde untersucht, ob die LASV GP-spezifischen Antikörper aus den aufgereinigten Kaninchenserum die Infektion von relevanten humanen Zielzellen hemmen können. Dafür wurde ein Virusneutralisationstest mit VSVΔG/LASVGP in humanen Hepatomazellen (HuH7) und einer differenzierten Monozyten-Zelllinie (THP-1 (Auwerx, 1991)) durchgeführt. Vero E6-zellen dienten als Kontrollzelllinie. Da die morphologischen Eigenschaften des durch VSVΔG/LASVGP-induzierten CPE je nach Zelllinie variieren und somit eine vergleichbare mikroskopische Auswertung erschweren, wurde ein Virusneutralisationstest etabliert, der auf dem Prinzip der Durchflusszytometrie basiert und eine Quantifizierung der infizierten Zellen unabhängig vom CPE erlaubt. Für die Durchführung wurden die IgG-Präparationen Rb#347_D77+ und Rb#350_D77+ seriell von 1:250 bis 1:1.000 verdünnt und mit VSVΔG/LASVGP für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Virus-Antikörper-Ansatz auf die entsprechenden Zellen gegeben. Nach 22 h post-Infektion wurden die Zellen mit einem polyklonalen anti-VSV Serum aus dem Meerschweinchen als Primärantikörper und einem FITC-gekoppelten Kaninchen anti-Meerschweinchen Sekundärantikörper gefärbt und der Anteil der infizierten Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Als Positivkontrolle dienten dabei VSVΔG/LASVGP-infizierte Zellen, die nicht mit den aufgereinigten IgG-Präparationen aus den Kaninchenhyperimmunserum inkubiert wurden. In der Analyse zeigte sich, dass alle untersuchten Zelllinien für eine Infektion mit VSVΔG/LASVGP empfänglich waren, wobei eine Zelltyp-abhängige Infektionseffizienz beobachtet wurde (Abb. 5.21a, Viruskontrolle). Bei gleicher Infektionsdosis wurden ca. 80% der HuH7-Zellen mit VSVΔG/LASVGP infiziert, wohingegen differenzierte THP-1-zellen mit einer Infektionseffizienz von ca. 45% infiziert wurden. Vero E6-Zellen wiesen eine Infektionseffizienz von ca. 55% auf. Die aufgereinigten Antikörper beider Kaninchenserum konnten die Infektion mit VSVΔG/LASVGP in allen getesteten Zelllinien hemmen (Abb. 5.21a).

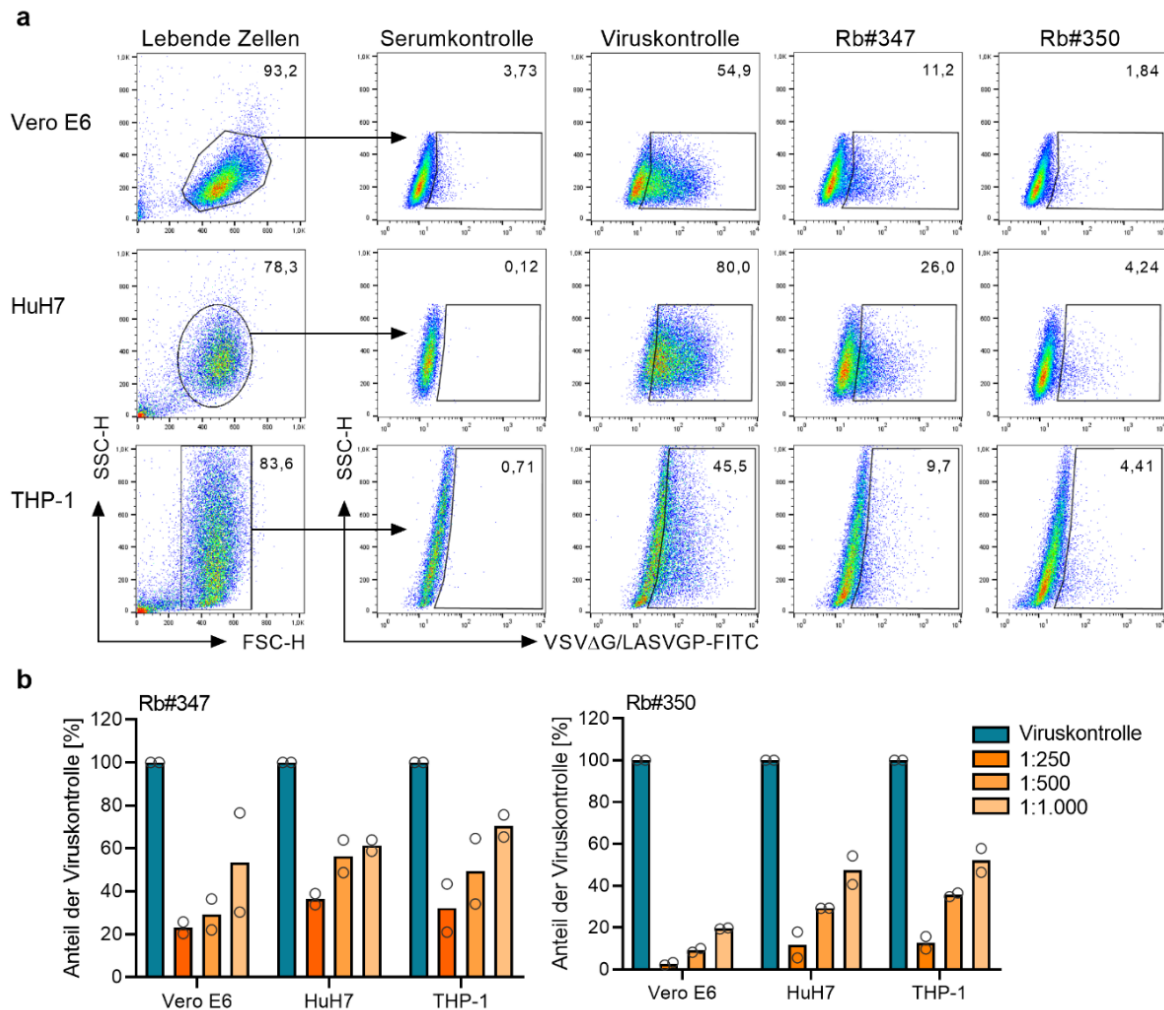


Abb. 5.21: Hemmung der VSVΔG/LASVGP Infektion in humanen LASV-Zielzellen. Die Neutralisation von VSVΔG/LASVGP durch die IgG-Präparationen Rb#347_D77+ und Rb#350_D77+ wurde in HuH7-Zellen, differenzierten THP-1-Zellen und Vero E6-Zellen mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Antikörper wurden seriell verdünnt und mit dem Virus vorinkubiert. Infizierte Zellen ohne Seruminkubation und nicht-infizierte Zellen dienten als Kontrolle. Nach 22 h wurden die Zellen geerntet, fixiert und mit einem polyklonalen Meerschweinchenserum gegen VSV und einem FITC-gekoppelten anti-Meerschweinchen Antikörper angefärbt. **(a)** Exemplarisch dargestellt sind die zweidimensionalen Streudiagramme von einem Versuch, bei dem eine 1:250 Verdünnung der IgG-Präparationen von Rb#347 und Rb#350 für den Virusneutralisationstest eingesetzt wurde. Der Anteil an lebenden Zellen wurde mittels der FSC-H/SSC-H Streuung, die auf der Zellgröße und Granularität beruht, bestimmt. Für jede Zelllinie wurden unbehandelte VSVΔG/LASVGP-infizierte Zellen als Positivkontrolle verwendet. Nicht-infizierte Zellen, die mit der höchsten Antikörperkonzentration inkubiert wurden, dienten als Negativkontrolle und wurden verwendet, um die Detektionsgrenzen zu definieren, in denen zwischen nicht-infizierten Zellen und infizierten Zellen (VSVΔG/LASVGP-positiv) unterschieden wurde. Angegeben ist der prozentuale Anteil der infizierten Zellen in Bezug auf alle gemessenen lebenden Zellen. **(b)** Der Anteil an infizierten Zellen ist abhängig von der verwendeten Serumverdünnung. Die Viruskontrolle wurde für jede Zelllinie auf 100% gesetzt, und der relative Anteil an infizierten Zellen wurde berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten. Abbildung aus (Müller et al., 2020).

Für die quantitative Auswertung wurde die Menge der infizierten Zellen in der Viruskontrolle der entsprechenden Zelllinie auf 100% gesetzt und der relative Anteil der infizierten Zellen berechnet. Dabei zeigte sich für die IgG-Präparationen ein dosisabhängiger neutralisierender Effekt (Abb. 5.21b). In Übereinstimmung mit den obigen Ergebnissen wurde in diesem Versuchsansatz ebenfalls eine höhere neutralisierende Aktivität für Rb#350_D77+ im Vergleich zu Rb#347_D77+ beobachtet.

In initialen Studien konnte beobachtet werden, dass die GP-spezifischen Antikörper aus den Kaninchenhyperimmunseren eine LASV-Infektion auch in humanen Atemwegsepithelzellen neutralisieren können. Dies wurde mit einem CPE-basierten VSVΔG/LASVGP-Neutralisationstest in A549- und 16HBE14o-Zellen untersucht (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die durch LASV GP VLP-induzierten neutralisierenden Antikörper in der Lage sind eine GP-vermittelte Infektion in relevanten humanen LASV-Zielzellen zu hemmen.

6 Diskussion

6.1 LASV-Infektion der humanen Atemwege

Der Respirationstrakt ist von einem respiratorischen Epithel ausgekleidet, das je nach Atemwegsabschnitt verschiedene Zelltypen enthält und durch die Zellpolarität eine mechanische Barriere für Pathogene darstellt (Bérubé et al., 2010; Förster, 2008). Diese Barriere verhindert, dass Viren und andere Pathogene in die Submukosa gelangen und sich auf diese Weise systemisch ausbreiten können. Zusätzlich wird der Zugang zu virusspezifischen Rezeptoren erschwert, die sich auf der basolateralen Membranseite der Epithelzellen befinden (Bergelson, 2009). Obwohl der humane Respirationstrakt eine wichtige Eintrittspforte für das LASV darstellt, ist der Mechanismus zur Überwindung der epithelialen Barriere bislang nicht näher untersucht worden. In früheren LASV-Infektionsstudien in polaren Nieren- oder Atemwegsepithelzellen konnte gezeigt werden, dass der virale Eintritt über die basolaterale Membran erfolgt, was sich mit der zellulären Lokalisation des LASV-Hauptrezeptors α -DG deckt (Dylla et al., 2008; Schlie et al., 2010a). In diesen Studien wurden jedoch immortalisierte Epithelzelllinien oder Epithelzellen nicht-humanen Ursprungs verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde unter Verwendung von differenzierten primären humanen bronchialen Epithelzellen gezeigt, dass das LASV das respiratorische Epithel mit einer vergleichbaren Effizienz über die apikale und basolaterale Seite infizieren kann. Im Gegensatz zum bipolaren Viruseintritt werden die neu synthetisierten Viruspartikel bevorzugt über die apikale Membran freigesetzt.

6.1.1 Bipolarer Viruseintritt und gerichtete Virusfreisetzung des LASV

Das Glykoprotein umhüllter Viren stellt eine wichtige Determinante für eine gerichtete Virusfreisetzung dar. Es konnte bereits für verschiedene Viren gezeigt werden, dass die Freisetzung infektiöser Viren an der Membranseite erfolgt, an der das virale Glykoprotein lokalisiert ist (Gottlieb et al., 1986; Owens und Compans, 1989). In den hier durchgeführten Studien konnte gezeigt werden, dass das LASV GP sowohl nach einer Infektion über die apikale Seite als auch nach einem Viruseintritt über die basolaterale Seite hauptsächlich an der apikalen Membran lokalisiert ist, wenn der epitheliale Zellverband noch intakt vorlag. Da in Infektionsstudien eine überwiegende Freisetzung infektiöser LASV-Partikel über die apikale Membranseite beobachtet wurde, ist die apikale Lokalisation des GP ebenfalls essentiell für eine gerichtete Freisetzung von LASV. N-gebundene Glykane sind in polaren Epithelzellen ein Signal für einen zellulären apikalen Proteintransport (Fiedler und Simons, 1995). Für das LASV GP wurde bereits beschrieben, dass es zahlreiche N-gebundene Glykane als post-translationale Modifikation trägt (Eichler et al., 2006). Weiterführende Studien müssen klären, in wie weit diese Zuckerstrukturen möglicherweise als Sortierungssignal bei dem apikalen Transport von GP beteiligt sind. Eine verstärkte LASV-Freisetzung über die apikale Membran wurde auch in polaren MDCK-Zellen beobachtet (Schlie et al., 2010a). Zudem konnten Warner *et al.* bei Infektionsstudien mit LCMV in polaren Caco2-Zellen, einer humanen Adenokarzinom-Zelllinie, ebenfalls eine gerichtete

Virusfreisetzung beobachten (Warner et al., 2018). Dabei kam es nach einer apikalen Infektion vorwiegend zu einer Virusfreisetzung über die apikale Zelloberfläche, während eine Infektion über die basolaterale Membran zu einer vergleichbaren Virusfreisetzung über die apikale und basolaterale Membranseite führte. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit Beobachtungen einer LASV-Infektion in differenzierten HBEpCs. In der vorliegenden Arbeit konnte ferner in Wachstumskinetiken beobachtet werden, dass die basolaterale Virusfreisetzung im Vergleich zur apikalen Virusfreisetzung unabhängig von der initialen Infektionsroute zeitlich verzögert ist. Im Gegensatz dazu wurde bei LCMV-Infektionsstudien in differenzierten humanen respiratorischen Epithelzellen beschrieben, dass sich der Viruseintritt ausschließlich auf die basolaterale Membran beschränkt (Dylla et al., 2008). In dieser Studie wurde die Expression des zellulären LCMV-Rezeptors α -DG sowohl auf der apikalen als auch auf der basolateralen Membran nachgewiesen, was die Interpretation der Befunde eines strikten basolateralen Viruseintritts von LCMV erschwerte (Dylla et al., 2008). Diese Daten legen daher nahe, dass neben der Expression von α -DG möglicherweise weitere zelluläre Faktoren für einen gerichteten Viruseintritt von LCMV in polaren Zellen notwendig sind. Für LASV wurde hingegen in dieser Arbeit ein bipolarer Viruseintritt beobachtet. Die bipolare Expression von α -DG könnte den LASV-Eintritt über beide Infektionsrouten unabhängig von weiteren zellulären Faktoren erklären. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die identifizierten LASV-Rezeptoren Axl, Tyro3, DC-SIGN oder LSECtin an dem Viruseintritt über die apikale oder basolaterale Membran beteiligt sind (Cao et al., 1998; Shimojima et al., 2012). Dies könnte den ausgeprägten Zelltropismus erklären, der bei einer LASV GP-vermittelten Infektion in HBEpCs beobachtet werden konnte, sowohl nach apikalem, als auch nach basolateralem Viruseintritt.

In früheren Studien wurde gezeigt, dass eine LASV-Infektion im Gegensatz zu anderen hämorrhagischen Fiebertoren, wie dem Marburgvirus die Integrität der TJ in polarisierten Endothelzellen nicht beeinträchtigt (Feldmann et al., 1996; Lukashevich et al., 1999; Schlie et al., 2010a). Grundsätzlich wird durch die Erkennung von dsRNA durch TLR3 die Expression von Thymus-Stromal-Lymphopoietin (TSLP) in den Atemwegsepithelzellen induziert, was zu einer Störung der TJ und somit der epithelialen Barriere führt (Gon et al., 2016). Das LASV NP besitzt eine dsRNA-spezifische Exonuklease-Aktivität, die zu einer Suppression der IRF3-Translokation führt und so die Aktivierung des angeborenen Immunsystems hemmt (Hastie et al., 2011a), was erklären könnte, weshalb LASV keinen Einfluss auf die Zellpolarität hat. In dieser Arbeit wurde jedoch ein Verlust der Epithelintegrität in einem späten Stadium der Infektion sowohl nach apikalem als auch basolateralem Viruseintritt beobachtet. Da die gemessenen Virustiter von apikal und basolateral freigesetzten Viren auch drei Tage nach der Infektion nicht ähnlich waren, ist zu vermuten, dass die Integrität der epithelialen Barriere nicht über den gesamten Zellverbund durch die LASV-Infektion beeinträchtigt wird. Die geringe Virusfreisetzung über die Basalmembran nach einer apikalen Infektion deutet darauf hin, dass

das humane respiratorische Epithel zwar für eine initiale LASV-Infektion empfänglich ist, die Überwindung der epithelialen Barriere jedoch wahrscheinlich nicht ausschließlich durch eine direkte Infektion der Atemwegsepithelzellen erfolgt. Zusätzlich deuten die Ergebnisse aus der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie darauf hin, dass die zelluläre LASV GP-Lokalisation von der Epithelintegrität abhängt. Die basolaterale Lokalisation von GP wurde nur in einem fortgeschrittenen Stadium der Infektion beobachtet, bei der keine Zellpolarität mehr besteht und somit vermutlich kein gerichteter zellulärer Proteintransport erfolgt. Auf Grund dieser Daten ergibt sich folgende Arbeitshypothese zu einer LASV-Infektion in den humanen Atemwegsepithelzellen.

Im Zuge einer Aerosolübertragung von LASV vom natürlichen Nagetierreservoir auf den Menschen werden zunächst die respiratorischen Epithelzellen apikal infiziert. Diese initiale Virusreplikation führt jedoch nicht zu einem Verlust der epithelialen Barriere. Die verstärkte apikale Virusfreisetzung könnte zu einer relativ hohen Viruslast in der Lunge führen, was die Infektion von mukosalen Immunzellen *in vivo* begünstigen könnte, da sie besonders empfänglich für eine LASV-Infektion sind (Baize et al., 2004). Diese Zellen könnten die epitheliale Barriere überwinden und das LASV anschließend zu lokalen Lymphknoten transportieren. Zusätzlich führt die kontinuierliche Virusreplikation in den Atemwegsepithelzellen zu einem Verlust der Epithelintegrität und schließlich zu einer Virusfreisetzung in die Submukosa. So könnte der Hauptrezeptor α -DG, der auf der basolateralen Membranseite lokalisiert ist, für das LASV auch nach apikaler Infektion zugänglich sein (Abb. 6.1). Alternativ kann es während der systemischen LASV-Ausbreitung zu einer Infektion des respiratorischen Epithels über die basolaterale Membran kommen.

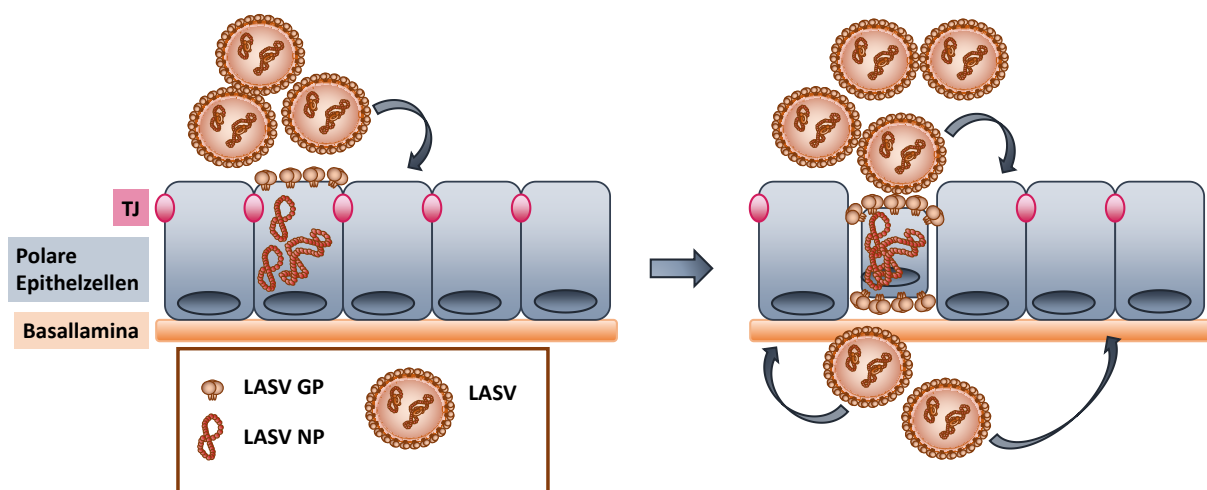


Abb. 6.1: Überwindung der epithelialen Barriere. LASV infiziert die polaren Zellen des respiratorischen Epithels über die apikale Membran. Die Virusfreisetzung findet zunächst nur über die apikale Membran statt, wo es zu einer Reinfektion von benachbarten Epithelzellen kommt. Im Verlauf der Infektion kommt es zum Verlust der Epithelintegrität, sodass das LASV zusätzlich in die Submukosa freigesetzt wird, wo es zu einer Infektion der Epithelzellen über die basolaterale Membran kommt.

In beiden Fällen kommt es zu einer effizienten Freisetzung infektiöser Viren über die apikale Membran, was die Virusübertragung über Atemwegssekrete *in vivo* begünstigen könnte. Ähnliche Pathogenitätsmechanismen zur Überwindung der epithelialen Barriere und einer anschließenden systemischen Streuung wurden für verschiedene Viren beschrieben. Das Masernvirus wird beispielsweise durch Aerosole übertragen, infiziert jedoch zunächst mononukleäre Zellen im Alveolarlumen, die das Virus zu lokalen Lymphknoten transportieren, wo es zur Infektion von Lymphozyten kommt, den wichtigsten Zielzellen des Masernvirus. Im Spätstadium der Infektion wird das Virus durch infizierte B- und T-Lymphozyten sowie dendritischen Zellen auf Epithelzellen der Atemwege übertragen. Die Masernvirus-Infektion erfolgt dabei basolateral über den spezifischen Rezeptor Nektin-4, und die Virusfreisetzung aus dem respiratorischen Epithel über die apikale Membranseite (de Vries et al., 2012; Delpeut et al., 2012). Das Mumpsvirus wird ebenfalls durch Aerosole oder direkten Kontakt mit virushaltigem Sekret übertragen. Es gelangt durch die Bindung an Sialinsäuren in die Epithelzellen und ist in der Lage, nach einer initialen Replikation in der nasalen Schleimhaut und den oberen Atemwegen, systemisch zu streuen (Hviid et al., 2008; Rubin et al., 2015). Das Varizella-Zoster-Virus hingegen wird nach dem Viruseintritt über die Atemwege, von infizierten dendritischen Zellen und Alveolarmakrophagen zu den regionalen Lymphknoten transportiert und kann sich auf diese Weise systemisch ausbreiten (Ouwendijk und Verjans, 2015).

Wie bereits erwähnt führt die LASV-Replikation in humanen Atemwegsepithelzellen zu einem Verlust der Epithelintegrität, was verschiedene molekulare Ursachen haben könnte. Eine Virusinfektion könnte entweder direkt zu einer Desorganisation der TJ- und AJ-Komplexe führen (Sajjan et al., 2008; Singh et al., 2007), oder indirekt durch die Induktion von pro-inflammatorischen Wirtszellfaktoren wie beispielsweise IFN und TNF- α (Coyne et al., 2002; Kampf et al., 1999). Insbesondere für IFN- λ konnte in Mäusen gezeigt werden, dass eine Induktion durch virale RNA zu einer Schädigung der epithelialen Barriere in den Atemwegen führen kann (Broggi et al., 2020). Welcher dieser Mechanismen im Falle einer LASV-Infektion eine Rolle spielen könnte, muss in weiteren Studien geklärt werden.

6.1.2 LASV-Zelltropismus im bronchialen Epithel

Das Atemwegsepithel setzt sich hauptsächlich aus sekretorischen, basalen und Zilien-tragenden Zelltypen zusammen. Bei primären, differenzierten HBEPs sind diese spezifischen Zelltypen nachweisbar (Dvorak et al., 2011). Daher eignet sich dieses Zellkultursystem für Studien zum Wirtszelltropismus von LASV in den humanen Atemwegen. Unter Verwendung von primären, differenzierten HBEPs konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass bei einem LASV-Eintritt über die basale Seite des Epithels die Basalzellen und Clubzellen initiale Zielzellen darstellen. Im Gegensatz dazu konnten nach einer apikalen Virusinfektion weder Becherzellen, Clubzellen noch Zilien-tragende Zellen als initiale Zielzellen identifiziert werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich bei den apikalen Zielzellen um einen nicht-Zilien-tragenden Zelltyp handelt. Für humane IAV konnte gezeigt werden,

dass eine Infektion des respiratorischen Epithels auch über nicht Zilien-tragende Zellen erfolgen kann (Matrosovich et al., 2004). Dies zeigt, dass für eine effiziente respiratorische Infektion ein viraler initialer Tropismus für Zilien-tragende Zellen nicht zwingend erforderlich ist.

Eine Voraussetzung für potenzielle Zielzellen ist, dass sie von der luminalen Seite zugänglich sind und nicht nur im proliferativen Kompartiment vorkommen, wie z.B. Basalzellen, Parabasalzellen oder Intermediärzellen (Boers et al., 1998). Pulmonale Neuroendokrine Zellen (PNEC) machen weniger als 1% der gesamten Zellpopulation im Lungenepithel aus und konnten nicht nur *in vivo*, sondern auch in primären Zellkulturen nachgewiesen werden (Boers et al., 1996; Gu et al., 2014). Sie treten als Einzelzellen oder in Cluster auf und reichen von der Basalmembran bis zum Lumen hin (Weichselbaum et al., 2005). Somit stellen PNECs potenzielle Zielzellen während einer apikalen LASV-Infektion dar. Weitere mögliche Zielzellen sind Bürstenzellen, die im oberen Respirationstrakt zu finden sind und etwa 1%-7% des Epithels repräsentieren (Jeffery, 1983; RHODIN und DALHAMN, 1956). Diese Zellen zeichnen sich durch apikale, bürstenähnliche Zellfortsätze und eine CK18-Expression aus (Höfer und Drenckhahn, 1992; Kasper et al., 1994), einem Zytokeratin, das in den differenzierten HBEPcs bereits nachgewiesen werden konnte. Neben der potenziellen Rolle dieser seltenen Zellen, ist es auch möglich, dass undifferenzierte Zellen, die noch kein spezifisches Zellmarkerprotein exprimieren, für den apikalen Viruseintritt in das Epithel verantwortlich sind.

Bei den Studien zum Wirtszelltropismus konnte gezeigt werden, dass VSVΔG/LASVGP die Clubzellen über die Basalmembran infizieren kann, jedoch nicht über die apikale Membran, obwohl es sich bei den Clubzellen um hochprismatische Zellen handelt, die das Lumen erreichen. Durch die TJ wird die Plasmamembran in eine apikale und eine basolaterale Domäne unterteilt, wodurch eine Zellpolarität entsteht (Cereijido et al., 1998; van Meer und Simons, 1986). Durch die Trennung in zwei Membrandomänen wird die Expression von apikalen und basolateralen Membrankomponenten auf die jeweilige Domäne beschränkt (Tsukita et al., 2001) und somit auch die Oberflächenexpression von spezifischen Rezeptoren. Da der Hauptrezeptor α -DG nachweislich auf der basolateralen Seite exprimiert wird, um dort die Epithelzellen mit der Basallamina zu verbinden, erfolgt der apikale Viruseintritt möglicherweise nur über die alternativen LASV-spezifischen Rezeptoren Axl und Tyro3 sowie DC-SIGN und LSECtin. Bislang ist jedoch unbekannt, auf welcher Membrandomäne der humanen Atemwegsepithelzellen diese Rezeptoren lokalisiert sind. Weiterführende Analysen bezüglich der Oberflächenexpression von LASV-spezifischen Rezeptoren in Abhängigkeit des Zelltyps würden wichtige Erkenntnisse zum LASV-Pathogenitätsmechanismus liefern und sind daher Gegenstand zukünftiger Studien.

6.1.3 IFN- λ -Induktion in HBEPcs

Typ I (IFN- α/β) und Typ III (IFN- λ) Interferone ähneln sich stark in ihrer Struktur, Regulierung und Funktion. Es wurde bereits beschrieben, dass LASV NP und das Matrixprotein Z die Induktion von Typ

I IFN hemmen können (Martínez-Sobrido et al., 2007; Xing et al., 2015). Bei der LASV-Infektion von HBEPc kommt es zu einer starken Induktion von IFN- λ , nicht aber von IFN- α/β .

Die Unterschiede in der IFN-Antwort von Typ I und III könnte darauf hinweisen, dass sich beide Typen nicht nur in ihren zell- und gewebespezifischen Expressionsmustern unterscheiden, sondern auch in der Wechselwirkung mit viralen Proteinen. IFN- λ ist für viele respiratorische Infektionskrankheiten von entscheidender Bedeutung, da die IFN- λ -spezifischen Rezeptoren in hohen Konzentrationen auf Epithelzellen exprimiert werden und ihre Expression auch auf der Oberfläche von HBEPc gezeigt wurde (Mordstein et al., 2010; Sauerhering et al., 2017). Die Expression kann durch virale RNA induziert werden, die über zelluläre Sensoren wie TLRs, RLRs oder NOD (*nucleotide binding oligomerization domain*)-ähnliche Rezeptoren detektiert wird (O'Neill und Bowie, 2010). Die Expression dieser antiviralen TLRs wurde in primären Epithelzellen der Atemwege nachgewiesen, sowohl intrazellulär als auch auf der Zelloberfläche, wobei TLR3 sowohl auf der apikalen als auch auf der basalen Membranen nachweisbar ist (Ioannidis et al., 2013).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine LASV-Infektion in HBEPcs sowohl über die apikale als auch die basolaterale Seite zu einer IFN- λ -Induktion führt, was auf eine mögliche virale RNA-Detektion durch TLR3 in apikalen und basalen Endosomen oder der jeweiligen Zelloberfläche hinweist. Die IFN- λ -Induktion ist nach einer basalen LASV-Infektion höher, was möglicherweise auf einen unterschiedlichen Zelltropismus für den apikalen und basalen Viruseintritt zurückzuführen ist. Im Falle eines basolateralen Viruseintritts sind darüber hinaus Basalzellen zugänglich, sodass mehr potentielle Zielzellen für eine Infektion zur Verfügung stehen. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass die zelluläre Lokalisation der Immunrezeptoren die Exposition gegenüber Pathogenen widerspiegelt. So ist die apikale Plasmamembran Pathogenen ausgesetzt, während die basolaterale Seite weitestgehend vor einem direkten Kontakt mit Pathogenen geschützt ist. So ist beispielsweise die Expression von TLR5 auf die basolaterale Seite von polarisierten humanen Kolonepithelzellen beschränkt und es konnte gezeigt werden, dass eine apikale Exposition mit dem Liganden nur nach einer Störung der epithelialen Barriere zu einer Stimulation führte (Gewirtz et al., 2001; Rhee et al., 2005). Im Falle einer LASV-Infektion in HBEPcs könnte die unterschiedlich starke IFN- λ -Induktion nach einer apikalen Infektion eine überschießende Immunreaktion verhindern, solange diese nicht invasiv ist, jedoch eine entsprechende Immunreaktion nach einer systemischen Infektion über die basolaterale Seite ermöglichen. Für TLR9 wurde gezeigt, dass es im Darmepithel sowohl an der apikalen als auch an der basolateralen Membran exprimiert wird, die Bindung der Liganden jedoch ein unterschiedliches zelluläres Signal auf der jeweiligen Kompartimentseite initiiert (Chabot et al., 2006). Durch die Vorstimulation mit IFN- λ wird in HBEPcs ein antiviraler Zustand etabliert, der sowohl zu einer reduzierten LASV-Replikation als auch zu einer reduzierten Virusfreisetzung über die apikale Membran führt. Die reduzierte gerichtete Virusfreisetzung ist vermutlich auf eine verminderte Replikation

zurückzuführen, da die Induktion der antiviralen Proteine keinen Einfluss auf die zelluläre Lokalisation von LASV GP zu haben scheint.

6.2 LASV GP VLPs induzieren neutralisierende Antikörper in hyperimmunisierten Tieren

Das Lassafieber ist eine akute Viruserkrankung, die mit einem schweren und lebensbedrohlichen Multiorganversagen und Hämorrhagien einhergehen kann. Das Fehlen einer wirksamen und für den Menschen zugelassenen Behandlungsmöglichkeit unterstreicht die Notwendigkeit, sichere und effektive Therapeutika und Impfstoffe zu entwickeln. Studien zur passiven Immunisierung mit Rekonvaleszentenserum und monoklonalen Antikörpern legen nahe, dass Antikörper-basierte Therapeutika einen wirksamen Ansatz für die Behandlung des LF darstellen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Hyperimmunisierung von Kaninchen mit LASV GP-induzierten VLPs die Bildung von spezifischen Antikörpern mit kreuzneutralisierender Aktivität induziert.

6.2.1 LASV GP VLPs sind immunogen und induzieren neutralisierende Antikörper

Die Erhaltung neutralisierender Epitope in einem Antigen ist für eine effiziente Induktion von neutralisierenden Antikörpern wichtig. Es konnte bereits gezeigt werden, dass neutralisierende humane monoklonale LASV-Antikörper an Epitope der Quartärstruktur binden, die nur bei dem nativen trimeren GP-Spike-Komplex exponiert sind (Hastie et al., 2017; Robinson et al., 2016). Daher wurden in dieser Arbeit LASV GP VLPs verwendet, die reife trimere GP-Spike-Strukturen auf der VLP-Oberfläche exprimieren (Schlie et al., 2010a). Für die Herstellung dieser VLPs in großem Maßstab wurde eine MDCK II-Zelllinie verwendet, die das LASV GP in voller Länge stabil exprimiert (Schlie et al., 2010a). In Kryoelektronenmikroskopie-Studien konnte gezeigt werden, dass die Ultrastruktur der immunogenen Ektodomäne von GP auf der Oberfläche von VLPs der Struktur von GP authentischer LASV-Virionen sehr stark ähnelt (Li et al., 2016). Dies legt die Vermutung nahe, dass LASV GP VLPs eine Antikörperantwort induzieren können, die der Antikörperantwort einer natürlichen LASV-Infektion entspricht. In früheren Studien wurde die Immunogenität von LASV VLPs beschrieben, die GP, NP und Z-Proteine ko-exprimierten (Branco et al., 2010). In dieser Studie wurden Mäuse mit VLPs in Abwesenheit eines Adjuvans immunisiert und die Induktion einer LASV-spezifischen Antikörperantwort nachgewiesen. Es wurde jedoch nicht untersucht, ob die Bildung von neutralisierenden Antikörpern induziert wurde.

Interessanterweise führte die VLP-Immunisierung zu einer robusten neutralisierenden Antikörperantwort, obwohl das vollständig glykosylierte LASV GP als Immunogen verwendet wurde. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu früheren Studien, in denen beschrieben wurde, dass sich das native GP nicht für eine effiziente Induktion von neutralisierenden Antikörpern eignet (Abreu-Mota et al., 2018; Sommerstein et al., 2015). Es wurde vermutet, dass die Glykanhülle des GP ursächlich

dafür ist und eine potentielle Immunevasionsstrategie des LASV darstellt (Watanabe et al., 2018). Infektionsstudien in Mäusen haben gezeigt, dass eine veränderte Anzahl der N-Glykane bei GP zu einer stärkeren Neutralisation durch GP-spezifische Antikörper führt und die Entfernung einzelner N-Glykane bei GP die Induktion von neutralisierenden Antikörpern steigert (Sommerstein et al., 2015). Jedoch sind die N-Glykane aufgrund ihrer Funktion bei der Faltung und Reifung des GP wichtige Komponenten für die Induktion einer biologisch relevanten GP-spezifischen Antikörperreaktion (Eichler et al., 2006). Dies deutet darauf hin, dass das native Glykosylierungsprofil für die effektive Induktion von neutralisierenden Antikörpern erforderlich ist.

Die neutralisierende Aktivität der Hyperimmunseren konnte in unterschiedlichen Testsystemen nachgewiesen werden, zum einen mit authentischem LASV, zum anderen mit zwei verschiedenen BSL2-Surrogatsystemen. Während die Neutralisationstiter nach der ersten Immunisierung noch sehr gering waren, konnte nach jeder weiteren Auffrischungsimpfung ein Anstieg der Neutralisationsaktivität beobachtet werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine effiziente neutralisierende Antikörperreaktion die mehrfache Immunisierung mit dem Antigen in seiner nativen Konformation erfordert. Die Immunisierung mit Adjuvanz-verstärkten LASV GP VLPs führte zur Induktion von neutralisierenden Antikörpern, deren Titer höher waren als die Neutralisationstiter, die in LASV GP IgG-positiven humanen Serumproben aus Guinea gemessen wurden. Die Behandlung von LF-Patienten mit Rekonvaleszentenseren wurde bereits in früheren klinischen Studien beschrieben. Jedoch sind hohe neutralisierende Antikörpertiter und eine Übereinstimmung der Antigene für eine erfolgreiche Therapie notwendig (Jahrling, 1983; Jahrling et al., 1984). Ob die Immunisierung mit LASV GP VLPs zur Bildung von ausreichend hohen Neutralisationstitern führt, um vor einer Infektion zu schützen bzw. den Krankheitsverlauf einer LF-Infektion zu verbessern, müsste zunächst in einem Versuchstiermodell mit dem authentischen LASV untersucht werden. Affinitätschromatographische Methoden zur Antigen-spezifischen Aufreinigung von Antikörpern könnten dabei zur Anreicherung von GP-spezifischen Antikörpern verwendet werden, und somit die neutralisierende Aktivität verstärken.

6.2.2 LASV GP VLP-induzierte Antikörper sind kreuzreaktiv

Das LASV-Genom weist ein hohes Maß an Sequenzvariabilität auf, was die Entwicklung eines wirksamen Pan-LASV-Impfstoffs und immuntherapeutischer Maßnahmen zu einer großen Herausforderung macht. Ein idealer Impfstoff oder Antikörper-basierter Therapieansatz muss daher einen Schutz gegen möglichst viele der zirkulierenden LASV-Stämme bieten. Bislang werden die LASV-Stämme in vier etablierte Linien eingeteilt. Die Linien I, II und III zirkulieren in Nigeria, während die Linie IV in mehreren anderen westafrikanischen Ländern, wie z.B. Guinea, Sierra Leone und Liberia zirkuliert (Bowen et al., 2000). Darüber hinaus wurden mehrere LASV-Stämme, die in Mali und der Elfenbeinküste (Linie V) (Manning et al., 2015), Nigeria (Linie VI) (Olayemi et al., 2016) und Togo (Linie VII) (Whitmer et al., 2018) zirkulieren, für taxonomisch neue unabhängige Linien vorgeschlagen. Trotz

dieser genetischen Vielfalt wurden mehrere humane monoklonale Antikörper mit einer kreuzneutralisierenden Aktivität beschrieben (Robinson et al., 2016). Durch Virusneutralisationstests mit authentischem LASV konnte gezeigt werden, dass die Immunisierung mit LASV GP VLPs zur Bildung von kreuzneutralisierenden Antikörpern führt. Diese polyklonalen Antikörper waren in der Lage neben der Neutralisation des LASV-Stammes Josiah der Linie IV, auch ein klinisches Isolat der Linie II zu neutralisieren, welches kürzlich während eines LF-Ausbruchs 2018 in Nigeria isoliert wurde (Kafetzopoulou et al., 2019). Zusätzlich konnte durch einen Pseudotyp-basierten Neutralisationstest gezeigt werden, dass die LASV GP-spezifischen Antikörper aus den hyperimmunisierten Kaninchen die Infektion von fünf verschiedenen LASV-Linien (I-V) neutralisieren können. Diese Ergebnisse zeigen, dass durch die VLP-Immunisierung kreuzreaktive und kreuzneutralisierende Antikörper gebildet wurden, die konservierte Epitope von LASV GP erkennen.

6.2.3 Neutralisationsmechanismus der GP VLP-induzierten Antikörper

LASV GP erfüllt mehrere wichtige Funktionen, die für eine erfolgreiche Virusreplikation notwendig sind. GP1 vermittelt die Bindung an die Wirtszellrezeptoren, während GP2 die Fusion der Virushülle mit der endosomalen Membran induziert (zusammengefasst in (Hallam et al., 2018b)). Die Immunisierung mit LASV GP VLPs führt zur Bildung von GP1- und GP2-spezifischen Antikörpern. Dies deutet darauf hin, dass die Hyperimmunseren verschiedene Wirkmechanismen bezüglich der Neutralisation von GP besitzen.

Antikörper können eine Virusinfektion durch unterschiedliche Mechanismen hemmen. Die Antikörper beider Kaninchenimmunseren hemmten die Virusinfektion, wenn sie mit VSVΔG/LASVGP vorinkubiert wurden und somit die Wechselwirkung zwischen dem LASV GP und den Wirtszell-Oberflächenrezeptoren blockierten. Darüber hinaus konnten die Antikörper des Kaninchenserums Rb#350 auch die Infektion nach Virusadsorption an die Plasmamembran hemmen. Dies deutet darauf hin, dass ein Teil der neutralisierenden Wirkung in einem Schritt nach der GP-Rezeptor-Bindung auf der Zelloberfläche erfolgt. Dabei könnte entweder die Internalisierung des Virus gehemmt sein oder die Konformationsänderung des GP blockiert werden, die für die Fusion der Virushülle mit der endosomalen Wirtsmembran essentiell ist. Dieser Mechanismus konnte z.B. für den humanen monoklonalen Antikörper 37.7H gezeigt werden. Dabei stabilisiert 37.7H die Präfusions-Konformation und hemmt so die Konformationsänderung, die für die intrazelluläre LAMP1-Bindung und die nachfolgende Virusfusion erforderlich ist (Hastie et al., 2017). Ein Struktur-basiertes Epitop-Mapping könnte dabei helfen, die Mechanismen der VLP-induzierten Antikörper aufzuklären, die bei der GP-Bindung und Neutralisierung eine Rolle spielen (Bianchi et al., 2018).

Darüber hinaus waren die Antikörper aus den Kaninchenhyperimmunseren in der Lage, die Virusinfektion von humanen Leberzellen, Makrophagen und Atemwegsepithelzellen *in vitro* zu hemmen. Insbesondere Immunzellen sind frühe Zielzellen bei einer LASV-Infektion im Menschen

(Baize et al., 2004). Die VLP-induzierten Antikörper könnten durch die Hemmung der Virusvermehrung eine weitere Virusausbreitung in einem frühen Stadium der Infektion *in vivo* blockieren. Zusätzlich könnten sie die Infektion des respiratorischen Epithels über die basolaterale Seite während der systemischen Krankheitsphase hemmen und dadurch möglicherweise die LASV-Freisetzung über Aerosole verhindern.

6.2.4 LASV GP VLP-induzierte Antikörper als potenzielle Therapie

Monoklonale Antikörper haben sich bereits in zahlreichen Studien als wirksam erwiesen, wobei ihre Herstellung aus den B-Zellen von Rekonvaleszenten jedoch zeit- und kostenintensiv ist. Zusätzlich können bereits geringfügige Veränderungen in der Epitopstruktur des Zielantigens dazu führen, dass ein monoklonaler Antikörper nicht mehr binden kann. Die hohe genetische Variabilität des LASV kann zum Auftreten von neuartigen LASV-Isolaten mit veränderter Antigenstruktur führen. Um das LASV im Falle einer Epidemie effektiv bekämpfen zu können, ist eine schnelle Bereitstellung von therapeutischen Antikörpern mit neutralisierender Aktivität erforderlich. Eine Alternative zu monoklonalen Antikörpern stellen dabei polyklonale neutralisierende Antiseren dar, die in hyperimmunisierten Tieren generiert wurden. Dieser Ansatz hatte sich bereits bei dem Ebolavirus als wirksame Strategie erwiesen (Dowall et al., 2016; Wang et al., 2019; Zheng et al., 2016).

Antikörpertherapien zur passiven Immunisierung werden seit langem für die Behandlung und die Postexpositionsprophylaxe verschiedener Krankheiten eingesetzt. Dazu zählen heterologe polyklonale Antikörperpräparate aus hyperimmunisierten Tieren, die gegen mehrere hochpathogene Viren wie Ebola, Junín und Nipah eingesetzt werden (Dowall et al., 2016; Dowall et al., 2017; Pan et al., 2020; Schmidt et al., 2018). Der VLP-basierte Ansatz zur Herstellung von therapeutischen Antikörpern bietet den Vorteil, dass die VLPs authentischen Virionen morphologisch sehr ähneln und dass durch die native Konformation der Antigene eine starke Immunantwort induziert wird (Grgacic und Anderson, 2006). Es wurde bereits für eine Vielzahl von Viren beschrieben, dass VLPs die funktionelle und native Form eines viralen Glykoproteins und damit seine antigenen Eigenschaften sehr gut darstellen. Zusätzlich können VLPs durch ihre morphologische Ähnlichkeit mit authentischen Viren Immunzellen stimulieren und eine effiziente humorale und zelluläre Immunantwort auslösen. Dies konnte bereits beispielsweise für Filoviren in verschiedenen Tiermodellen gezeigt werden (Sun et al., 2009; Warfield et al., 2003; Warfield et al., 2004). Darüber hinaus haben sich erregerspezifische neutralisierende Antiseren, die durch eine VLP-Immunisierung hergestellt wurden, als erfolgreich bei der Behandlung von Virusinfektionen erwiesen (Schmidt et al., 2018). Ein Großteil der neutralisierenden anti-LASV GP-Antikörper bindet an Epitope der Quartärstruktur, die Regionen sowohl von GP1 als auch von GP2 umfassen (Hastie et al., 2017; Robinson et al., 2016). Die LASV GP VLPs exprimieren auf ihrer Oberfläche ein korrekt gefaltetes GP in seiner nativen Konformation und haben damit einen Vorteil gegenüber Impfstoffen, die auf LASV GP-Untereinheiten basieren (Borenstein-Katz et al., 2019; Galan-

Navarro et al., 2017). Die Seren von hyperimmunisierten Tieren enthalten vermutlich polyklonale Antikörper, die an verschiedene Epitope auf dem LASV GP binden können und somit die Entstehung von Quasispezies durch immunologische Selektion reduzieren. Da VLPs kein virales Genom enthalten, sind sie nicht replikationsfähig und somit auch nicht infektiös. Dies bietet den Vorteil, dass VLPs nach der Herstellung nicht chemisch inaktiviert werden müssen und es zu keinem Verlust der Wirksamkeit als Impfstoff durch mögliche Änderungen in der Proteinstruktur oder den Epitopen kommt. Zusätzlich können bei dem Auftreten von phylogenetisch neuen LASV-Isolaten, die sich in ihren antigenen Eigenschaften gegenüber anderen LASV-Isolaten unterscheiden, durch verfügbare Sequenzinformationen Zellkultur-basierte GP VLPs schnell hergestellt und polyklonale Antiseren in großem Maßstab im Tier generiert werden. Somit könnten Hyperimmunseren oder IgG-Präparate eine erfolgreiche Alternative zu humanen monoklonalen Antikörpern darstellen. In Kaninchen generierte IgG-Präparate werden bereits für die Behandlung bestimmter Erkrankungen eingesetzt und sind im Allgemeinen gut verträglich. Zum Beispiel werden anti-Thymozyten Antikörper, die im Kaninchen generiert wurden, für die Prävention und Behandlung akuter Abstoßungsreaktionen bei Organtransplantationen eingesetzt (Deeks und Keating, 2009).

Bei der Immunisierung der Kaninchen wurde das Sigma-Adjuvanz-System als Impfstoffverstärker eingesetzt. Es bleibt zu klären, ob sich neutralisierende Antikörper durch die Immunisierung mit LASV GP VLPs auch in Abwesenheit eines Adjuvanz induzieren lassen. Zusätzlich könnte die Verwendung von anderen Adjuvanzien zu einer effizienteren Antikörperantwort führen. Zukünftige Studien sind daher erforderlich, um die Wirksamkeit verschiedener Adjuvanz-Systeme systematisch zu untersuchen (Cimica und Galarza, 2017; Cross et al., 2016).

Die passive Immunisierung mit humanen monoklonalen neutralisierenden Antikörpern, die gegen LASV GP gerichtet sind, konnte im Tiermodell bereits erfolgreich vor einer LF-Infektion schützen (Ghaderi et al., 2012; Mire et al., 2017). Obwohl die neutralisierende Aktivität der Kaninchenserum in mehreren *in vitro* Testsystemen gezeigt werden konnte, muss die therapeutische Wirksamkeit im Tiermodell evaluiert werden.

Für die Herstellung der LASV GP VLPs wurden stabil transfizierte Hundenierenzellen verwendet (Schlie et al., 2010a). Die Untersuchungen zu dem Glykosylierungsstatus der GP VLPs haben gezeigt, dass das Glykosylierungsprofil dem von authentischen LASV aus humanen Zellen und Nagetierzellen entspricht. Obwohl die N-verknüpfte Glykan-Biosynthese über Säugetierzelltypen hinweg hoch konserviert ist, kann es zu speziesspezifischen Variationen kommen, die möglicherweise eine Auswirkung auf die Immunogenität des Zielantigens haben. Darüber hinaus sind nur humane Zelllinien in der Lage, Proteine mit post-translationalen Modifikationen (PTMs) zu synthetisieren, die denen des Menschen entsprechen (Daigneault et al., 2010). Daher ist die Herstellung einer stabil LASV GP-transfizierten

humanen Zelllinie, die das human-spezifische Glykosylierungsmuster der PTMs erzeugen kann, für die Generierung von LASV GP VLPs in Planung.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass LASV GP VLPs in Kombination mit einem Adjuvanz-System immunreaktiv sind und im Kaninchen eine starke und kreuzneutralisierende Antikörperreaktion induzieren können. Die gewonnenen Daten sind eine erfolgreiche Basis für weiterführende Studien, um die potenzielle Wirksamkeit heterologer Hyperimmunseren tierischen Ursprungs als mögliche Behandlungsoption gegen das hochpathogene LASV aufzuzeigen.

Literaturverzeichnis

- Abreu-Mota, T., K. R. Hagen, K. Cooper, P. B. Jahrling, G. Tan, C. Wirblich, R. F. Johnson, and M. J. Schnell, 2018, Non-neutralizing antibodies elicited by recombinant Lassa-Rabies vaccine are critical for protection against Lassa fever: *Nat Commun*, v. 9, p. 4223.
- Alexopoulou, L., A. C. Holt, R. Medzhitov, and R. A. Flavell, 2001, Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3: *Nature*, v. 413, p. 732-8.
- Ali, M., E. P. Lillehoj, Y. Park, Y. Kyo, and K. C. Kim, 2011, Analysis of the proteome of human airway epithelial secretions: *Proteome Sci*, v. 9, p. 4.
- Amanat, F., J. Duehr, L. Oestereich, K. M. Hastie, E. Ollmann Saphire, and F. Krammer, 2018, Antibodies to the Glycoprotein GP2 Subunit Cross-React between Old and New World Arenaviruses: *mSphere*, v. 3.
- Andersen, K. G., B. J. Shapiro, C. B. Matranga, R. Sealfon, A. E. Lin, L. M. Moses, O. A. Folarin, A. Goba, I. Odia, P. E. Ehiane, M. Momoh, E. M. England, S. Winnicki, L. M. Branco, S. K. Gire, E. Phelan, R. Tariyal, R. Tewhey, O. Omoniwa, M. Fullah, R. Fonnies, M. Fonnies, L. Kanneh, S. Jalloh, M. Gbakie, S. Saffa, K. Karbo, A. D. Gladden, J. Qu, M. Stremlau, M. Nekoui, H. K. Finucane, S. Tabrizi, J. J. Vitti, B. Birren, M. Fitzgerald, C. McCowan, A. Ireland, A. M. Berlin, J. Bochicchio, B. Tazon-Vega, N. J. Lennon, E. M. Ryan, Z. Bjornson, D. A. Milner, A. K. Lukens, N. Broodie, M. Rowland, M. Heinrich, M. Akdag, J. S. Schieffelin, D. Levy, H. Akpan, D. G. Bausch, K. Rubins, J. B. McCormick, E. S. Lander, S. Günther, L. Hensley, S. Okogbenin, S. F. Schaffner, P. O. Okokhere, S. H. Khan, D. S. Grant, G. O. Akpede, D. A. Asogun, A. Gnirke, J. Z. Levin, C. T. Happi, R. F. Garry, P. C. Sabeti, and V. H. F. Consortium, 2015, Clinical Sequencing Uncovers Origins and Evolution of Lassa Virus: *Cell*, v. 162, p. 738-50.
- Auperin, D. D., M. Galinski, and D. H. Bishop, 1984, The sequences of the N protein gene and intergenic region of the S RNA of pichinde arenavirus: *Virology*, v. 134, p. 208-19.
- Auperin, D. D., D. R. Sasso, and J. B. McCormick, 1986, Nucleotide sequence of the glycoprotein gene and intergenic region of the Lassa virus S genome RNA: *Virology*, v. 154, p. 155-67.
- Auwerx, J., 1991, The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation: *Experientia*, v. 47, p. 22-31.
- Ayers, M. M., and P. K. Jeffery, 1988, Proliferation and differentiation in mammalian airway epithelium: *Eur Respir J*, v. 1, p. 58-80.
- Baize, S., J. Kaplon, C. Faure, D. Pannetier, M. C. Georges-Courbot, and V. Deubel, 2004, Lassa virus infection of human dendritic cells and macrophages is productive but fails to activate cells: *J Immunol*, v. 172, p. 2861-9.
- Bajpai, S., J. Correia, Y. Feng, J. Figueiredo, S. X. Sun, G. D. Longmore, G. Suriano, and D. Wirtz, 2008, {alpha}-Catenin mediates initial E-cadherin-dependent cell-cell recognition and subsequent bond strengthening: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 105, p. 18331-6.
- Bals, R., C. Beisswenger, S. Blouquit, and T. Chinet, 2004, Isolation and air-liquid interface culture of human large airway and bronchiolar epithelial cells: *J Cyst Fibros*, v. 3 Suppl 2, p. 49-51.
- Bals, R., and P. S. Hiemstra, 2004, Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens: *Eur Respir J*, v. 23, p. 327-33.
- Barresi, R., and K. P. Campbell, 2006, Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease: *J Cell Sci*, v. 119, p. 199-207.
- Bergelson, J. M., 2009, Intercellular junctional proteins as receptors and barriers to virus infection and spread: *Cell Host Microbe*, v. 5, p. 517-21.
- Bianchi, M., H. L. Turner, B. Nogal, C. A. Cottrell, D. Oyen, M. Pauthner, R. Bastidas, R. Nedellec, L. E. McCoy, I. A. Wilson, D. R. Burton, A. B. Ward, and L. Hangartner, 2018, Electron-Microscopy-Based Epitope Mapping Defines Specificities of Polyclonal Antibodies Elicited during HIV-1 BG505 Envelope Trimer Immunization: *Immunity*, v. 49, p. 288-300.e8.
- Biron, C. A., K. B. Nguyen, G. C. Pien, L. P. Cousens, and T. P. Salazar-Mather, 1999, Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines: *Annu Rev Immunol*, v. 17, p. 189-220.

- Blaise, G. A., D. Gauvin, M. Gangal, and S. Authier, 2005, Nitric oxide, cell signaling and cell death: *Toxicology*, v. 208, p. 177-92.
- Blobel, G. A., R. Moll, W. W. Franke, and I. Vogt-Moykopf, 1984, Cytokeratins in normal lung and lung carcinomas. I. Adenocarcinomas, squamous cell carcinomas and cultured cell lines: *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, v. 45, p. 407-29.
- Boers, J. E., A. W. Ambergen, and F. B. Thunnissen, 1998, Number and proliferation of basal and parabasal cells in normal human airway epithelium: *Am J Respir Crit Care Med*, v. 157, p. 2000-6.
- Boers, J. E., J. L. den Brok, J. Koudstaal, J. W. Arends, and F. B. Thunnissen, 1996, Number and proliferation of neuroendocrine cells in normal human airway epithelium: *Am J Respir Crit Care Med*, v. 154, p. 758-63.
- Bonhomme, C. J., A. A. Capul, E. J. Lauron, L. H. Bederka, K. A. Knopp, and M. J. Buchmeier, 2011, Glycosylation modulates arenavirus glycoprotein expression and function: *Virology*, v. 409, p. 223-33.
- Borenstein-Katz, A., A. Shulman, H. Hamawi, O. Leitner, and R. Diskin, 2019, Differential Antibody-Based Immune Response against Isolated GP1 Receptor-Binding Domains from Lassa and Junín Viruses: *J Virol*, v. 93.
- Borrow, P., and M. B. Oldstone, 1994, Mechanism of lymphocytic choriomeningitis virus entry into cells: *Virology*, v. 198, p. 1-9.
- Bowen, M. D., P. E. Rollin, T. G. Ksiazek, H. L. Hustad, D. G. Bausch, A. H. Demby, M. D. Bajani, C. J. Peters, and S. T. Nichol, 2000, Genetic diversity among Lassa virus strains: *J Virol*, v. 74, p. 6992-7004.
- Branco, L. M., J. N. Grove, F. J. Geske, M. L. Boisen, I. J. Muncy, S. A. Magliato, L. A. Henderson, R. J. Schoepp, K. A. Cashman, L. E. Hensley, and R. F. Garry, 2010, Lassa virus-like particles displaying all major immunological determinants as a vaccine candidate for Lassa hemorrhagic fever: *Virol J*, v. 7, p. 279.
- Bredenbeek, P. J., R. Molenkamp, W. J. Spaan, V. Deubel, P. Marianneau, M. S. Salvato, D. Moshkoff, J. Zapata, I. Tikhonov, J. Patterson, R. Carrion, A. Ticer, K. Brasky, and I. S. Lukashevich, 2006, A recombinant Yellow Fever 17D vaccine expressing Lassa virus glycoproteins: *Virology*, v. 345, p. 299-304.
- Broggi, A., S. Ghosh, B. Sposito, R. Spreafico, F. Balzarini, A. Lo Cascio, N. Clementi, M. De Santis, N. Mancini, F. Granucci, and I. Zanoni, 2020, Type III interferons disrupt the lung epithelial barrier upon viral recognition: *Science*, v. 369, p. 706-712.
- Brunotte, L., M. Lelke, M. Hass, K. Kleinsteinbecker, B. Becker-Ziaja, and S. Günther, 2011, Domain structure of Lassa virus L protein: *J Virol*, v. 85, p. 324-33.
- Button, B., L. H. Cai, C. Ehre, M. Kesimer, D. B. Hill, J. K. Sheehan, R. C. Boucher, and M. Rubinstein, 2012, A periciliary brush promotes the lung health by separating the mucus layer from airway epithelia: *Science*, v. 337, p. 937-41.
- Bérubé, K., Z. Prytherch, C. Job, and T. Hughes, 2010, Human primary bronchial lung cell constructs: the new respiratory models: *Toxicology*, v. 278, p. 311-8.
- Cao, W., M. D. Henry, P. Borrow, H. Yamada, J. H. Elder, E. V. Ravkov, S. T. Nichol, R. W. Compans, K. P. Campbell, and M. B. Oldstone, 1998, Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus: *Science*, v. 282, p. 2079-81.
- Capul, A. A., J. C. de la Torre, and M. J. Buchmeier, 2011, Conserved residues in Lassa fever virus Z protein modulate viral infectivity at the level of the ribonucleoprotein: *J Virol*, v. 85, p. 3172-8.
- Carnec, X., M. Mateo, A. Page, S. Reynard, J. Hortion, C. Picard, E. Yekwa, L. Barrot, S. Barron, A. Vallve, H. Raoul, C. Carbonnelle, F. Ferron, and S. Baize, 2018, A Vaccine Platform against Arenaviruses Based on a Recombinant Hyperattenuated Mopeia Virus Expressing Heterologous Glycoproteins: *J Virol*, v. 92.
- Cashman, K. A., E. R. Wilkinson, C. I. Shaia, P. R. Facemire, T. M. Bell, J. J. Bearss, J. D. Shamblin, S. E. Wollen, K. E. Broderick, N. Y. Sardesai, and C. S. Schmaljohn, 2017, A DNA vaccine delivered

- by dermal electroporation fully protects cynomolgus macaques against Lassa fever: *Hum Vaccin Immunother*, v. 13, p. 2902-2911.
- Cereijido, M., J. Valdés, L. Shoshani, and R. G. Contreras, 1998, Role of tight junctions in establishing and maintaining cell polarity: *Annu Rev Physiol*, v. 60, p. 161-77.
- Chabot, S., J. S. Wagner, S. Farrant, and M. R. Neutra, 2006, TLRs regulate the gatekeeping functions of the intestinal follicle-associated epithelium: *J Immunol*, v. 176, p. 4275-83.
- Charrel, R. N., X. de Lamballerie, and S. Emonet, 2008, Phylogeny of the genus Arenavirus: *Curr Opin Microbiol*, v. 11, p. 362-8.
- Choppin, P. W., and A. Scheid, 1980, The role of viral glycoproteins in adsorption, penetration, and pathogenicity of viruses: *Rev Infect Dis*, v. 2, p. 40-61.
- Cimica, V., and J. M. Galarza, 2017, Adjuvant formulations for virus-like particle (VLP) based vaccines: *Clin Immunol*, v. 183, p. 99-108.
- Clegg, J. C., and J. D. Oram, 1985, Molecular cloning of Lassa virus RNA: nucleotide sequence and expression of the nucleocapsid protein gene: *Virology*, v. 144, p. 363-72.
- Cohen, M., X. Q. Zhang, H. P. Senaati, H. W. Chen, N. M. Varki, R. T. Schooley, and P. Gagneux, 2013, Influenza A penetrates host mucus by cleaving sialic acids with neuraminidase: *Virol J*, v. 10, p. 321.
- Control, N. C. f. D., 2020, Lassa fever Situation Report Epi Week 47: 16 – 22 November 2020, <https://ncdc.gov.ng/diseases/sitreps/?cat=5&name=An%20update%20of%20Lassa%20fever%20outbreak%20in%20Nigeria>.
- Coyne, C. B., T. M. Gambling, R. C. Boucher, J. L. Carson, and L. G. Johnson, 2003, Role of claudin interactions in airway tight junctional permeability: *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, v. 285, p. L1166-78.
- Coyne, C. B., M. K. Vanhook, T. M. Gambling, J. L. Carson, R. C. Boucher, and L. G. Johnson, 2002, Regulation of airway tight junctions by proinflammatory cytokines: *Mol Biol Cell*, v. 13, p. 3218-34.
- Cross, R. W., C. E. Mire, L. M. Branco, J. B. Geisbert, M. M. Rowland, M. L. Heinrich, A. Goba, M. Momoh, D. S. Grant, M. Fullah, S. H. Khan, J. E. Robinson, T. W. Geisbert, and R. F. Garry, 2016, Treatment of Lassa virus infection in outbred guinea pigs with first-in-class human monoclonal antibodies: *Antiviral Res*, v. 133, p. 218-222.
- Crotta, S., S. Davidson, T. Mahlakoiv, C. J. Desmet, M. R. Buckwalter, M. L. Albert, P. Staeheli, and A. Wack, 2013, Type I and type III interferons drive redundant amplification loops to induce a transcriptional signature in influenza-infected airway epithelia: *PLoS Pathog*, v. 9, p. e1003773.
- Daigneault, M., J. A. Preston, H. M. Marriott, M. K. Whyte, and D. H. Dockrell, 2010, The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages: *PLoS One*, v. 5, p. e8668.
- Dalton, A. J., W. P. Rowe, G. H. Smith, R. E. Wilsnack, and W. E. Pugh, 1968, Morphological and cytochemical studies on lymphocytic choriomeningitis virus: *J Virol*, v. 2, p. 1465-78.
- de Swart, R. L., M. Ludlow, L. de Witte, Y. Yanagi, G. van Amerongen, S. McQuaid, S. Yüksel, T. B. Geijtenbeek, W. P. Duprex, and A. D. Osterhaus, 2007, Predominant infection of CD150+ lymphocytes and dendritic cells during measles virus infection of macaques: *PLoS Pathog*, v. 3, p. e178.
- de Vries, R. D., A. W. Mesman, T. B. Geijtenbeek, W. P. Duprex, and R. L. de Swart, 2012, The pathogenesis of measles: *Curr Opin Virol*, v. 2, p. 248-55.
- Deeks, E. D., and G. M. Keating, 2009, Rabbit antithymocyte globulin (thymoglobulin): a review of its use in the prevention and treatment of acute renal allograft rejection: *Drugs*, v. 69, p. 1483-512.
- Delpout, S., R. S. Noyce, R. W. Siu, and C. D. Richardson, 2012, Host factors and measles virus replication: *Curr Opin Virol*, v. 2, p. 773-83.

- Djavani, M., I. S. Lukashevich, A. Sanchez, S. T. Nichol, and M. S. Salvato, 1997, Completion of the Lassa fever virus sequence and identification of a RING finger open reading frame at the L RNA 5' End: *Virology*, v. 235, p. 414-8.
- Doerr, H. W., and W. H. Gerlich, 2010, *Medizinische Virologie Grundlagen, Diagnostik, Prävention und Therapie viraler Erkrankungen*, v. 2, Thieme, p. 595-599.
- Dowall, S. D., J. Callan, A. Zeltina, I. Al-Abdulla, T. Strecker, S. K. Fehling, V. Krähling, A. Bosworth, E. Rayner, I. Taylor, S. Charlton, J. Landon, I. Cameron, R. Hewson, A. Nasidi, T. A. Bowden, and M. W. Carroll, 2016, Development of a Cost-effective Ovine Polyclonal Antibody-Based Product, EBOTAb, to Treat Ebola Virus Infection: *J Infect Dis*, v. 213, p. 1124-33.
- Dowall, S. D., F. Jacquot, J. Landon, E. Rayner, G. Hall, C. Carbonnelle, H. Raoul, D. Pannetier, I. Cameron, R. Coxon, I. Al Abdulla, R. Hewson, and M. W. Carroll, 2017, Post-exposure treatment of non-human primates lethally infected with Ebola virus with EBOTAb, a purified ovine IgG product: *Sci Rep*, v. 7, p. 4099.
- Drees, F., S. Pokutta, S. Yamada, W. J. Nelson, and W. I. Weis, 2005, Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly: *Cell*, v. 123, p. 903-15.
- Dvorak, A., A. E. Tilley, R. Shaykhiev, R. Wang, and R. G. Crystal, 2011, Do airway epithelium air-liquid cultures represent the in vivo airway epithelium transcriptome?: *Am J Respir Cell Mol Biol*, v. 44, p. 465-73.
- Dylla, D. E., D. E. Michele, K. P. Campbell, and P. B. McCray, 2008, Basolateral entry and release of New and Old World arenaviruses from human airway epithelia: *J Virol*, v. 82, p. 6034-8.
- Eberhardt, K. A., J. Mischlinger, S. Jordan, M. Groger, S. Günther, and M. Ramharther, 2019, Ribavirin for the treatment of Lassa fever: A systematic review and meta-analysis: *Int J Infect Dis*, v. 87, p. 15-20.
- Ehichioya, D. U., S. Dellicour, M. Pahlmann, T. Rieger, L. Oestereich, B. Becker-Ziaja, D. Cadar, Y. Ighodalo, T. Olokori, E. Omomoh, J. Oyakhilome, R. Omiunu, J. Agbukor, B. Ebo, J. Aiyepada, P. Ebhodaghe, B. Osiemi, S. Ehikhametalar, P. Akhilomen, M. Airende, R. Esumeh, E. Muoebonam, R. Giwa, A. Ekanem, G. Igenegbale, G. Odigie, G. Okonofua, R. Enigbe, E. Omonegho Yerumoh, E. Pallasch, S. Bockholt, L. E. Kafetzopoulou, S. Duraffour, P. O. Okokhere, G. O. Akpede, S. A. Okogbenin, I. Odia, C. Aire, N. Akpede, E. Tobin, E. Ogbaini-Emovon, P. Lemey, D. I. Adomeh, D. A. Asogun, and S. Günther, 2019, Phylogeography of Lassa Virus in Nigeria: *J Virol*, v. 93.
- Eichler, R., O. Lenz, W. Garten, and T. Strecker, 2006, The role of single N-glycans in proteolytic processing and cell surface transport of the Lassa virus glycoprotein GP-C: *Virol J*, v. 3, p. 41.
- Eichler, R., O. Lenz, T. Strecker, M. Eickmann, H. D. Klenk, and W. Garten, 2003a, Identification of Lassa virus glycoprotein signal peptide as a trans-acting maturation factor: *EMBO Rep*, v. 4, p. 1084-8.
- Eichler, R., O. Lenz, T. Strecker, and W. Garten, 2003b, Signal peptide of Lassa virus glycoprotein GP-C exhibits an unusual length: *FEBS Lett*, v. 538, p. 203-6.
- Eichler, R., T. Strecker, L. Kolesnikova, J. ter Meulen, W. Weissenhorn, S. Becker, H. D. Klenk, W. Garten, and O. Lenz, 2004, Characterization of the Lassa virus matrix protein Z: electron microscopic study of virus-like particles and interaction with the nucleoprotein (NP): *Virus Res*, v. 100, p. 249-55.
- Evans, M. J., L. S. Van Winkle, M. V. Fanucchi, and C. G. Plopper, 2001, Cellular and molecular characteristics of basal cells in airway epithelium: *Exp Lung Res*, v. 27, p. 401-15.
- Fan, L., T. Briesse, and W. I. Lipkin, 2010, Z proteins of New World arenaviruses bind RIG-I and interfere with type I interferon induction: *J Virol*, v. 84, p. 1785-91.
- Farsani, S. M., M. Deijis, R. Dijkman, R. Molenkamp, R. E. Jeeninga, M. Ieven, H. Goossens, and L. van der Hoek, 2015, Culturing of respiratory viruses in well-differentiated pseudostratified human airway epithelium as a tool to detect unknown viruses: *Influenza Other Respir Viruses*, v. 9, p. 51-7.

- Fehling, S. K., F. Lennartz, and T. Strecker, 2012, Multifunctional nature of the arenavirus RING finger protein Z: *Viruses*, v. 4, p. 2973-3011.
- Fehling, S. K., T. Noda, A. Maisner, B. Lamp, K. K. Conzelmann, Y. Kawaoka, H. D. Klenk, W. Garten, and T. Strecker, 2013, The microtubule motor protein KIF13A is involved in intracellular trafficking of the Lassa virus matrix protein Z: *Cell Microbiol*, v. 15, p. 315-34.
- Feldmann, H., H. Bugany, F. Mahner, H. D. Klenk, D. Drenckhahn, and H. J. Schnittler, 1996, Filovirus-induced endothelial leakage triggered by infected monocytes/macrophages: *J Virol*, v. 70, p. 2208-14.
- Fichet-Calvet, E., B. Becker-Ziaja, L. Koivogui, and S. Günther, 2014, Lassa serology in natural populations of rodents and horizontal transmission: *Vector Borne Zoonotic Dis*, v. 14, p. 665-74.
- Fiedler, K., and K. Simons, 1995, The role of N-glycans in the secretory pathway: *Cell*, v. 81, p. 309-12.
- Fisher-Hoch, S. P., L. Hutwagner, B. Brown, and J. B. McCormick, 2000, Effective vaccine for lassa fever: *J Virol*, v. 74, p. 6777-83.
- Fisher-Hoch, S. P., J. B. McCormick, D. Auperin, B. G. Brown, M. Castor, G. Perez, S. Ruo, A. Conaty, L. Brammer, and S. Bauer, 1989, Protection of rhesus monkeys from fatal Lassa fever by vaccination with a recombinant vaccinia virus containing the Lassa virus glycoprotein gene: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 86, p. 317-21.
- Frame, J. D., G. P. Verbrugge, R. G. Gill, and L. Pinneo, 1984, The use of Lassa fever convalescent plasma in Nigeria: *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 78, p. 319-24.
- Förster, C., 2008, Tight junctions and the modulation of barrier function in disease: *Histochem Cell Biol*, v. 130, p. 55-70.
- Galan-Navarro, C., M. Rincon-Restrepo, G. Zimmer, E. Ollmann Saphire, J. A. Hubbell, S. Hirosue, M. A. Swartz, and S. Kunz, 2017, Oxidation-sensitive polymersomes as vaccine nanocarriers enhance humoral responses against Lassa virus envelope glycoprotein: *Virology*, v. 512, p. 161-171.
- Galani, I. E., V. Triantafyllia, E. E. Eleminiadou, O. Koltsida, A. Stavropoulos, M. Manioudaki, D. Thanos, S. E. Doyle, S. V. Kotenko, K. Thanopoulou, and E. Andreakos, 2017, Interferon- λ Mediates Non-redundant Front-Line Antiviral Protection against Influenza Virus Infection without Compromising Host Fitness: *Immunity*, v. 46, p. 875-890.e6.
- Ganesan, S., A. T. Comstock, and U. S. Sajjan, 2013, Barrier function of airway tract epithelium: *Tissue Barriers*, v. 1, p. e24997.
- Garbutt, M., R. Liebscher, V. Wahl-Jensen, S. Jones, P. Möller, R. Wagner, V. Volchkov, H. D. Klenk, H. Feldmann, and U. Ströher, 2004, Properties of replication-competent vesicular stomatitis virus vectors expressing glycoproteins of filoviruses and arenaviruses: *J Virol*, v. 78, p. 5458-65.
- Geisbert, T. W., S. Jones, E. A. Fritz, A. C. Shurtleff, J. B. Geisbert, R. Liebscher, A. Grolla, U. Ströher, L. Fernando, K. M. Daddario, M. C. Guttieri, B. R. Mothé, T. Larsen, L. E. Hensley, P. B. Jahrling, and H. Feldmann, 2005, Development of a new vaccine for the prevention of Lassa fever: *PLoS Med*, v. 2, p. e183.
- Gerlach, T., L. Kühling, J. Uhlendorff, V. Laukemper, T. Matrosovich, V. Czudai-Matwich, F. Schwalm, H. D. Klenk, and M. Matrosovich, 2012, Characterization of the neuraminidase of the H1N1/09 pandemic influenza virus: *Vaccine*, v. 30, p. 7348-52.
- Gewirtz, A. T., T. A. Navas, S. Lyons, P. J. Godowski, and J. L. Madara, 2001, Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression: *J Immunol*, v. 167, p. 1882-5.
- Ghaderi, D., M. Zhang, N. Hurtado-Ziola, and A. Varki, 2012, Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation: *Biotechnol Genet Eng Rev*, v. 28, p. 147-75.
- Gibb, R., L. M. Moses, D. W. Redding, and K. E. Jones, 2017, Understanding the cryptic nature of Lassa fever in West Africa: *Pathog Glob Health*, v. 111, p. 276-288.

- Gon, Y., S. Maruoka, H. Kishi, Y. Kozu, K. Kuroda, K. Mizumura, Y. Nomura, T. Oshima, and S. Hashimoto, 2016, DsRNA disrupts airway epithelial barrier integrity through down-regulation of claudin members: *Allergol Int*, v. 65 Suppl, p. S56-8.
- Gottlieb, T. A., A. Gonzalez, L. Rizzolo, M. J. Rindler, M. Adesnik, and D. D. Sabatini, 1986, Sorting and endocytosis of viral glycoproteins in transfected polarized epithelial cells: *J Cell Biol*, v. 102, p. 1242-55.
- Gray, T. E., K. Guzman, C. W. Davis, L. H. Abdullah, and P. Nettesheim, 1996, Mucociliary differentiation of serially passaged normal human tracheobronchial epithelial cells: *Am J Respir Cell Mol Biol*, v. 14, p. 104-12.
- Grgacic, E. V., and D. A. Anderson, 2006, Virus-like particles: passport to immune recognition: *Methods*, v. 40, p. 60-5.
- Gu, X., P. H. Karp, S. L. Brody, R. A. Pierce, M. J. Welsh, M. J. Holtzman, and Y. Ben-Shahar, 2014, Chemosensory functions for pulmonary neuroendocrine cells: *Am J Respir Cell Mol Biol*, v. 50, p. 637-46.
- Günther, S., and O. Lenz, 2004, Lassa virus: *Crit Rev Clin Lab Sci*, v. 41, p. 339-90.
- Hajj, R., T. Baranek, R. Le Naour, P. Lesimple, E. Puchelle, and C. Coraux, 2007, Basal cells of the human adult airway surface epithelium retain transit-amplifying cell properties: *Stem Cells*, v. 25, p. 139-48.
- Hallam, H. J., S. Hallam, S. E. Rodriguez, A. D. T. Barrett, D. W. C. Beasley, A. Chua, T. G. Ksiazek, G. N. Milligan, V. Sathiyamoorthy, and L. M. Reece, 2018a, Baseline mapping of Lassa fever virology, epidemiology and vaccine research and development: *NPJ Vaccines*, v. 3, p. 11.
- Hallam, S. J., T. Koma, J. Maruyama, and S. Paessler, 2018b, Review of Mammarenavirus Biology and Replication: *Front Microbiol*, v. 9, p. 1751.
- Haller, O., and G. Kochs, 2002, Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity: *Traffic*, v. 3, p. 710-7.
- Hastie, K. M., C. R. Kimberlin, M. A. Zandonatti, I. J. MacRae, and E. O. Saphire, 2011a, Structure of the Lassa virus nucleoprotein reveals a dsRNA-specific 3' to 5' exonuclease activity essential for immune suppression: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 108, p. 2396-401.
- Hastie, K. M., T. Liu, S. Li, L. B. King, N. Ngo, M. A. Zandonatti, V. L. Woods, J. C. de la Torre, and E. O. Saphire, 2011b, Crystal structure of the Lassa virus nucleoprotein-RNA complex reveals a gating mechanism for RNA binding: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 108, p. 19365-70.
- Hastie, K. M., M. A. Zandonatti, L. M. Kleinfelter, M. L. Heinrich, M. M. Rowland, K. Chandran, L. M. Branco, J. E. Robinson, R. F. Garry, and E. O. Saphire, 2017, Structural basis for antibody-mediated neutralization of Lassa virus: *Science*, v. 356, p. 923-928.
- Hatrup, C. L., and S. J. Gendler, 2008, Structure and function of the cell surface (tethered) mucins: *Annu Rev Physiol*, v. 70, p. 431-57.
- Hepojoki, J., S. Hepojoki, T. Smura, L. Szilovics, E. Dervas, B. Prähauser, L. Nufer, E. M. Schraner, O. Vapalahti, A. Kipar, and U. Hetzel, 2018, Characterization of Haartman Institute snake virus-1 (HISV-1) and HISV-like viruses-The representatives of genus Hartmanivirus, family Arenaviridae: *PLoS Pathog*, v. 14, p. e1007415.
- Hovenberg, H. W., J. R. Davies, and I. Carlstedt, 1996, Different mucins are produced by the surface epithelium and the submucosa in human trachea: identification of MUC5AC as a major mucin from the goblet cells: *Biochem J*, v. 318 (Pt 1), p. 319-24.
- Husain, M., and K. S. Harrod, 2009, Influenza A virus-induced caspase-3 cleaves the histone deacetylase 6 in infected epithelial cells: *FEBS Lett*, v. 583, p. 2517-20.
- Hviid, A., S. Rubin, and K. Mühlemann, 2008, Mumps: *Lancet*, v. 371, p. 932-44.
- Höfer, D., and D. Drenckhahn, 1992, Identification of brush cells in the alimentary and respiratory system by antibodies to villin and fimbrin: *Histochemistry*, v. 98, p. 237-42.
- Ibraghimov-Beskrovnaya, O., J. M. Ervasti, C. J. Leveille, C. A. Slaughter, S. W. Sernett, and K. P. Campbell, 1992, Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix: *Nature*, v. 355, p. 696-702.

- Ioannidis, I., F. Ye, B. McNally, M. Willette, and E. Flaño, 2013, Toll-like receptor expression and induction of type I and type III interferons in primary airway epithelial cells: *J Virol*, v. 87, p. 3261-70.
- Iwasaki, M., N. Ngo, B. Cubitt, and J. C. de la Torre, 2015, Efficient Interaction Between Arenavirus Nucleoprotein (NP) And RNA-Dependent RNA Polymerase (L) Is Mediated By The Virus Nucleocapsid (NP-RNA) Template: *J Virol*.
- Jae, L. T., M. Raaben, A. S. Herbert, A. I. Kuehne, A. S. Wirchnianski, T. K. Soh, S. H. Stubbs, H. Janssen, M. Damme, P. Saftig, S. P. Whelan, J. M. Dye, and T. R. Brummelkamp, 2014, Virus entry. Lassa virus entry requires a trigger-induced receptor switch: *Science*, v. 344, p. 1506-10.
- Jahrling, P. B., 1983, Protection of Lassa virus-infected guinea pigs with Lassa-immune plasma of guinea pig, primate, and human origin: *J Med Virol*, v. 12, p. 93-102.
- Jahrling, P. B., J. D. Frame, J. B. Rhoderick, and M. H. Monson, 1985, Endemic Lassa fever in Liberia. IV. Selection of optimally effective plasma for treatment by passive immunization: *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 79, p. 380-4.
- Jahrling, P. B., and C. J. Peters, 1984, Passive antibody therapy of Lassa fever in cynomolgus monkeys: importance of neutralizing antibody and Lassa virus strain: *Infect Immun*, v. 44, p. 528-33.
- Jahrling, P. B., C. J. Peters, and E. L. Stephen, 1984, Enhanced treatment of Lassa fever by immune plasma combined with ribavirin in cynomolgus monkeys: *J Infect Dis*, v. 149, p. 420-7.
- Jeffery, P. K., 1983, Morphologic features of airway surface epithelial cells and glands: *Am Rev Respir Dis*, v. 128, p. S14-20.
- Kafetzopoulou, L. E., S. T. Pullan, P. Lemey, M. A. Suchard, D. U. Ehichioya, M. Pahlmann, A. Thielebein, J. Hinzmann, L. Oestereich, D. M. Wozniak, K. Efthymiadis, D. Schachten, F. Koenig, J. Matjeschk, S. Lorenzen, S. Lumley, Y. Ighodalo, D. I. Adomeh, T. Olorok, E. Omomoh, R. Omiunu, J. Agbukor, B. Ebo, J. Aiyepada, P. Ebhodaghe, B. Osiemi, S. Ekhikhametalar, P. Akhilomen, M. Airende, R. Esumeh, E. Muoebonam, R. Giwa, A. Ekanem, G. Igenegbale, G. Odigie, G. Okonofua, R. Enigbe, J. Oyakhilome, E. O. Yerumoh, I. Odia, C. Aire, M. Okonofua, R. Atafo, E. Tobin, D. Asogun, N. Akpede, P. O. Okokhere, M. O. Rafiu, K. O. Iraoyah, C. O. Iruolagbe, P. Akhideno, C. Eramah, G. Akpede, E. Isibor, D. Naidoo, R. Hewson, J. A. Hiscox, R. Vipond, M. W. Carroll, C. Ihekweazu, P. Formenty, S. Okogbenin, E. Ogbaini-Emovon, S. Günther, and S. Duraffour, 2019, Metagenomic sequencing at the epicenter of the Nigeria 2018 Lassa fever outbreak: *Science*, v. 363, p. 74-77.
- Kampf, C., A. J. Relova, S. Sandler, and G. M. Roomans, 1999, Effects of TNF-alpha, IFN-gamma and IL-beta on normal human bronchial epithelial cells: *Eur Respir J*, v. 14, p. 84-91.
- Kasper, M., D. Höfer, J. Woodcock-Mitchell, A. Migheli, A. Attanasio, T. Rudolf, M. Müller, and D. Drenckhahn, 1994, Colocalization of cytokeratin 18 and villin in type III alveolar cells (brush cells) of the rat lung: *Histochemistry*, v. 101, p. 57-62.
- Kawai, T., and S. Akira, 2008, Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling: *Ann N Y Acad Sci*, v. 1143, p. 1-20.
- Kernéis, S., L. Koivogui, N. Magassouba, K. Koulemou, R. Lewis, A. Aplogan, R. F. Grais, P. J. Guerin, and E. Fichet-Calvet, 2009, Prevalence and risk factors of Lassa seropositivity in inhabitants of the forest region of Guinea: a cross-sectional study: *PLoS Negl Trop Dis*, v. 3, p. e548.
- Kesimer, M., S. Kirkham, R. J. Pickles, A. G. Henderson, N. E. Alexis, G. Demaria, D. Knight, D. J. Thornton, and J. K. Sheehan, 2009, Tracheobronchial air-liquid interface cell culture: a model for innate mucosal defense of the upper airways?: *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, v. 296, p. L92-L100.
- Klewitz, C., H. D. Klenk, and J. ter Meulen, 2007a, Amino acids from both N-terminal hydrophobic regions of the Lassa virus envelope glycoprotein GP-2 are critical for pH-dependent membrane fusion and infectivity: *J Gen Virol*, v. 88, p. 2320-8.
- Klewitz, C., H. D. Klenk, and J. Ter Meulen, 2007b, Amino acids from both N-terminal hydrophobic regions of the Lassa virus envelope glycoprotein GP-2 are critical for pH-dependent membrane fusion and infectivity: *J Gen Virol*, v. 88, p. 2320-2328.

- Knowles, M. R., and R. C. Boucher, 2002, Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways: *J Clin Invest*, v. 109, p. 571-7.
- Koetzler, R., R. S. Zaheer, R. Newton, and D. Proud, 2009, Nitric oxide inhibits IFN regulatory factor 1 and nuclear factor-kappaB pathways in rhinovirus-infected epithelial cells: *J Allergy Clin Immunol*, v. 124, p. 551-7.
- Kranzusch, P. J., A. D. Schenk, A. A. Rahmeh, S. R. Radoshitzky, S. Bavari, T. Walz, and S. P. Whelan, 2010, Assembly of a functional Machupo virus polymerase complex: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 107, p. 20069-74.
- Kranzusch, P. J., and S. P. Whelan, 2011, Arenavirus Z protein controls viral RNA synthesis by locking a polymerase-promoter complex: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 108, p. 19743-8.
- Le Goffic, R., J. Pothlichet, D. Vitour, T. Fujita, E. Meurs, M. Chignard, and M. Si-Tahar, 2007, Cutting Edge: Influenza A virus activates TLR3-dependent inflammatory and RIG-I-dependent antiviral responses in human lung epithelial cells: *J Immunol*, v. 178, p. 3368-72.
- Lenz, O., J. ter Meulen, H. Feldmann, H. D. Klenk, and W. Garten, 2000, Identification of a novel consensus sequence at the cleavage site of the Lassa virus glycoprotein: *J Virol*, v. 74, p. 11418-21.
- Lenz, O., J. ter Meulen, H. D. Klenk, N. G. Seidah, and W. Garten, 2001, The Lassa virus glycoprotein precursor GP-C is proteolytically processed by subtilase SKI-1/S1P: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 98, p. 12701-5.
- Li, S., Z. Sun, R. Pryce, M. L. Parsy, S. K. Fehling, K. Schlie, C. A. Siebert, W. Garten, T. A. Bowden, T. Strecker, and J. T. Huiskonen, 2016, Acidic pH-Induced Conformations and LAMP1 Binding of the Lassa Virus Glycoprotein Spike: *PLoS Pathog*, v. 12, p. e1005418.
- Lopez-Souza, N., G. Dolganov, R. Dubin, L. A. Sachs, L. Sassina, H. Sporer, S. Yagi, D. Schnurr, H. A. Boushey, and J. H. Widdicombe, 2004, Resistance of differentiated human airway epithelium to infection by rhinovirus: *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, v. 286, p. L373-81.
- Loureiro, M. E., M. Wilda, J. M. Livingston Macleod, A. D'Antuono, S. Foscaldi, C. Marino Buslje, and N. Lopez, 2011, Molecular determinants of arenavirus Z protein homo-oligomerization and L polymerase binding: *J Virol*, v. 85, p. 12304-14.
- Lukashevich, I. S., M. Djavani, K. Shapiro, A. Sanchez, E. Ravkov, S. T. Nichol, and M. S. Salvato, 1997, The Lassa fever virus L gene: nucleotide sequence, comparison, and precipitation of a predicted 250 kDa protein with monospecific antiserum: *J Gen Virol*, v. 78 (Pt 3), p. 547-51.
- Lukashevich, I. S., R. Maryankova, A. S. Vladyko, N. Nashkevich, S. Koleda, M. Djavani, D. Horejsh, N. N. Voitenok, and M. S. Salvato, 1999, Lassa and Mopeia virus replication in human monocytes/macrophages and in endothelial cells: different effects on IL-8 and TNF-alpha gene expression: *J Med Virol*, v. 59, p. 552-60.
- Lukashevich, I. S., J. Patterson, R. Carrion, D. Moshkoff, A. Ticer, J. Zapata, K. Brasky, R. Geiger, G. B. Hubbard, J. Bryant, and M. S. Salvato, 2005, A live attenuated vaccine for Lassa fever made by reassortment of Lassa and Mopeia viruses: *J Virol*, v. 79, p. 13934-42.
- López, N., R. Jácamo, and M. T. Franze-Fernández, 2001, Transcription and RNA replication of tacaribe virus genome and antigenome analogs require N and L proteins: Z protein is an inhibitor of these processes: *J Virol*, v. 75, p. 12241-51.
- Mahlakõiv, T., P. Hernandez, K. Gronke, A. Diefenbach, and P. Staeheli, 2015, Leukocyte-derived IFN- α/β and epithelial IFN- λ constitute a compartmentalized mucosal defense system that restricts enteric virus infections: *PLoS Pathog*, v. 11, p. e1004782.
- Manning, J. T., N. Forrester, and S. Paessler, 2015, Lassa virus isolates from Mali and the Ivory Coast represent an emerging fifth lineage: *Front Microbiol*, v. 6, p. 1037.
- Martínez-Sobrido, L., P. Giannakas, B. Cubitt, A. García-Sastre, and J. C. de la Torre, 2007, Differential inhibition of type I interferon induction by arenavirus nucleoproteins: *J Virol*, v. 81, p. 12696-703.
- Mateo, M., S. Reynard, X. Carnec, A. Journeaux, N. Baillet, J. Schaeffer, C. Picard, C. Legras-Lachuer, R. Allan, E. Perthame, K. H. Hillion, N. Pietrosemoli, M. A. Dillies, L. Barrot, A. Vallve, S. Barron, L. Fellmann, J. C. Gaillard, J. Armengaud, C. Carbonnelle, H. Raoul, F. Tangy, and S. Baize, 2019,

- Vaccines inducing immunity to Lassa virus glycoprotein and nucleoprotein protect macaques after a single shot: *Sci Transl Med*, v. 11.
- Matrosovich, M., T. Matrosovich, J. Uhlenhorff, W. Garten, and H. D. Klenk, 2007, Avian-virus-like receptor specificity of the hemagglutinin impedes influenza virus replication in cultures of human airway epithelium: *Virology*, v. 361, p. 384-90.
- Matrosovich, M. N., T. Y. Matrosovich, T. Gray, N. A. Roberts, and H. D. Klenk, 2004, Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 101, p. 4620-4.
- McCormick, J. B., 1987, Epidemiology and control of Lassa fever: *Curr Top Microbiol Immunol*, v. 134, p. 69-78.
- McCormick, J. B., I. J. King, P. A. Webb, K. M. Johnson, R. O'Sullivan, E. S. Smith, S. Trippel, and T. C. Tong, 1987a, A case-control study of the clinical diagnosis and course of Lassa fever: *J Infect Dis*, v. 155, p. 445-55.
- McCormick, J. B., I. J. King, P. A. Webb, C. L. Scribner, R. B. Craven, K. M. Johnson, L. H. Elliott, and R. Belmont-Williams, 1986, Lassa fever. Effective therapy with ribavirin: *N Engl J Med*, v. 314, p. 20-6.
- McCormick, J. B., P. A. Webb, J. W. Krebs, K. M. Johnson, and E. S. Smith, 1987b, A prospective study of the epidemiology and ecology of Lassa fever: *J Infect Dis*, v. 155, p. 437-44.
- Message, S. D., and S. L. Johnston, 2004, Host defense function of the airway epithelium in health and disease: clinical background: *J Leukoc Biol*, v. 75, p. 5-17.
- Meulen, J., M. Badusche, J. Satoguina, T. Strecker, O. Lenz, C. Loeliger, M. Sakho, K. Koulemou, L. Koivogui, and A. Hoerauf, 2004, Old and New World arenaviruses share a highly conserved epitope in the fusion domain of the glycoprotein 2, which is recognized by Lassa virus-specific human CD4+ T-cell clones: *Virology*, v. 321, p. 134-43.
- Miknis, Z. J., E. Magracheva, W. Li, A. Zdanov, S. V. Kotenko, and A. Wlodawer, 2010, Crystal structure of human interferon- λ 1 in complex with its high-affinity receptor interferon- λ R1: *J Mol Biol*, v. 404, p. 650-64.
- Miller, A. L., R. M. Strieter, A. D. Gruber, S. B. Ho, and N. W. Lukacs, 2003, CXCR2 regulates respiratory syncytial virus-induced airway hyperreactivity and mucus overproduction: *J Immunol*, v. 170, p. 3348-56.
- Mire, C. E., R. W. Cross, J. B. Geisbert, V. Borisevich, K. N. Agans, D. J. Deer, M. L. Heinrich, M. M. Rowland, A. Goba, M. Momoh, M. L. Boisen, D. S. Grant, M. Fullah, S. H. Khan, K. A. Fenton, J. E. Robinson, L. M. Branco, R. F. Garry, and T. W. Geisbert, 2017, Human-monoclonal-antibody therapy protects nonhuman primates against advanced Lassa fever: *Nat Med*, v. 23, p. 1146-1149.
- Moll, R., M. Divo, and L. Langbein, 2008, The human keratins: biology and pathology: *Histochem Cell Biol*, v. 129, p. 705-33.
- Moll, R., W. W. Franke, D. L. Schiller, B. Geiger, and R. Krepler, 1982, The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells: *Cell*, v. 31, p. 11-24.
- Mordstein, M., E. Neugebauer, V. Ditt, B. Jessen, T. Rieger, V. Falcone, F. Sorgeloos, S. Ehl, D. Mayer, G. Kochs, M. Schwemmle, S. Günther, C. Drosten, T. Michiels, and P. Staeheli, 2010, Lambda interferon renders epithelial cells of the respiratory and gastrointestinal tracts resistant to viral infections: *J Virol*, v. 84, p. 5670-7.
- Mori, I., T. Komatsu, K. Takeuchi, K. Nakakuki, M. Sudo, and Y. Kimura, 1995, In vivo induction of apoptosis by influenza virus: *J Gen Virol*, v. 76 (Pt 11), p. 2869-73.
- Morin, B., B. Coutard, M. Lelke, F. Ferron, R. Kerber, S. Jamal, A. Frangeul, C. Baronti, R. Charrel, X. de Lamballerie, C. Vonrhein, J. Lescar, G. Bricogne, S. Günther, and B. Canard, 2010, The N-terminal domain of the arenavirus L protein is an RNA endonuclease essential in mRNA transcription: *PLoS Pathog*, v. 6, p. e1001038.
- Müller, H., 2015, Untersuchungen zur Lassavirus-Infektion in humanen respiratorischen Epithelzellen, Philipps-Universität Marburg.

- Müller, H., S. K. Fehling, J. Dorna, R. A. Urbanowicz, L. Oestereich, Y. Krebs, L. Kolesnikova, M. Schauflinger, V. Krähling, N. Magassouba, E. Fichet-Calvet, J. K. Ball, A. Kaufmann, S. Bauer, S. Becker, V. von Messling, and T. Strecker, 2020, Adjuvant formulated virus-like particles expressing native-like forms of the Lassa virus envelope surface glycoprotein are immunogenic and induce antibodies with broadly neutralizing activity: *NPJ Vaccines*, v. 5, p. 71.
- Naim, H. Y., E. Ehler, and M. A. Billeter, 2000, Measles virus matrix protein specifies apical virus release and glycoprotein sorting in epithelial cells: *EMBO J*, v. 19, p. 3576-85.
- Nunberg, J. H., and J. York, 2012, The curious case of arenavirus entry, and its inhibition: *Viruses*, v. 4, p. 83-101.
- O'Neill, L. A., and A. G. Bowie, 2010, Sensing and signaling in antiviral innate immunity: *Curr Biol*, v. 20, p. R328-33.
- Ogbu, O., E. Ajuluchukwu, and C. J. Uneke, 2007, Lassa fever in West African sub-region: an overview: *J Vector Borne Dis*, v. 44, p. 1-11.
- Olayemi, A., D. Cadar, N. Magassouba, A. Obadare, F. Kourouma, A. Oyeyiola, S. Fasogbon, J. Igbokwe, T. Rieger, S. Bockholt, H. Jérôme, J. Schmidt-Chanasit, M. Garigliany, S. Lorenzen, F. Igbahenah, J. N. Fichet, D. Ortsega, S. Omilabu, S. Günther, and E. Fichet-Calvet, 2016, New Hosts of The Lassa Virus: *Sci Rep*, v. 6, p. 25280.
- Ouwendijk, W. J., and G. M. Verjans, 2015, Pathogenesis of varicelloviruses in primates: *J Pathol*, v. 235, p. 298-311.
- Owens, R. J., and R. W. Compans, 1989, Expression of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein is restricted to basolateral surfaces of polarized epithelial cells: *J Virol*, v. 63, p. 978-82.
- Pan, X., Y. Wu, W. Wang, L. Zhang, and G. Xiao, 2020, Development of horse neutralizing immunoglobulin and immunoglobulin fragments against Junín virus: *Antiviral Res*, v. 174, p. 104666.
- Perez, M., R. C. Craven, and J. C. de la Torre, 2003, The small RING finger protein Z drives arenavirus budding: implications for antiviral strategies: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 100, p. 12978-83.
- Perez, M., D. L. Greenwald, and J. C. de la Torre, 2004, Myristoylation of the RING finger Z protein is essential for arenavirus budding: *J Virol*, v. 78, p. 11443-8.
- Persson, B. D., A. B. Jaffe, R. Fearn, and H. Danahay, 2014, Respiratory syncytial virus can infect basal cells and alter human airway epithelial differentiation: *PLoS One*, v. 9, p. e102368.
- Peterhans, E., 1997, Oxidants and antioxidants in viral diseases: disease mechanisms and metabolic regulation: *J Nutr*, v. 127, p. 962S-965S.
- Phelps, D. S., and J. Floros, 1991, Localization of pulmonary surfactant proteins using immunohistochemistry and tissue in situ hybridization: *Exp Lung Res*, v. 17, p. 985-95.
- Pinschewer, D. D., M. Perez, and J. C. de la Torre, 2005, Dual role of the lymphocytic choriomeningitis virus intergenic region in transcription termination and virus propagation: *J Virol*, v. 79, p. 4519-26.
- Player, M. R., and P. F. Torrence, 1998, The 2-5A system: modulation of viral and cellular processes through acceleration of RNA degradation: *Pharmacol Ther*, v. 78, p. 55-113.
- Pohl, C., M. I. Hermanns, C. Uboldi, M. Bock, S. Fuchs, J. Dei-Anang, E. Mayer, K. Kehe, W. Kummer, and C. J. Kirkpatrick, 2009, Barrier functions and paracellular integrity in human cell culture models of the proximal respiratory unit: *Eur J Pharm Biopharm*, v. 72, p. 339-49.
- Price, M. E., S. P. Fisher-Hoch, R. B. Craven, and J. B. McCormick, 1988, A prospective study of maternal and fetal outcome in acute Lassa fever infection during pregnancy: *BMJ*, v. 297, p. 584-7.
- Qian, X., T. Karpova, A. M. Sheppard, J. McNally, and D. R. Lowy, 2004, E-cadherin-mediated adhesion inhibits ligand-dependent activation of diverse receptor tyrosine kinases: *EMBO J*, v. 23, p. 1739-48.

- Quinlan, R. A., D. L. Schiller, M. Hatzfeld, T. Achtstätter, R. Moll, J. L. Jorcano, T. M. Magin, and W. W. Franke, 1985, Patterns of expression and organization of cytokeratin intermediate filaments: *Ann N Y Acad Sci*, v. 455, p. 282-306.
- Rao, R., 2009, Occludin phosphorylation in regulation of epithelial tight junctions: *Ann N Y Acad Sci*, v. 1165, p. 62-8.
- Raphael, G. D., E. V. Jeney, J. N. Baraniuk, I. Kim, S. D. Meredith, and M. A. Kaliner, 1989, Pathophysiology of rhinitis. Lactoferrin and lysozyme in nasal secretions: *J Clin Invest*, v. 84, p. 1528-35.
- Rate, A., J. W. Upham, A. Bosco, K. L. McKenna, and P. G. Holt, 2009, Airway epithelial cells regulate the functional phenotype of locally differentiating dendritic cells: implications for the pathogenesis of infectious and allergic airway disease: *J Immunol*, v. 182, p. 72-83.
- Reed, L. J., and H. Muench, 1938, A simple method of estimating fifty percent endpoints: *The American Journal of Hygiene*, v. 27, p. 493-497.
- Regamey, N., C. Obregon, S. Ferrari-Lacraz, C. van Leer, M. Chanson, L. P. Nicod, and T. Geiser, 2007, Airway epithelial IL-15 transforms monocytes into dendritic cells: *Am J Respir Cell Mol Biol*, v. 37, p. 75-84.
- Rhee, S. H., E. Im, M. Riegler, E. Kokkotou, M. O'brien, and C. Pothoulakis, 2005, Pathophysiological role of Toll-like receptor 5 engagement by bacterial flagellin in colonic inflammation: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 102, p. 13610-5.
- RHODIN, J., and T. DALHAMN, 1956, Electron microscopy of the tracheal ciliated mucosa in rat: *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, v. 44, p. 345-412.
- Robinson, J. E., K. M. Hastie, R. W. Cross, R. E. Yenni, D. H. Elliott, J. A. Rouelle, C. B. Kannadka, A. A. Smira, C. E. Garry, B. T. Bradley, H. Yu, J. G. Shaffer, M. L. Boisen, J. N. Hartnett, M. A. Zandonatti, M. M. Rowland, M. L. Heinrich, L. Martínez-Sobrido, B. Cheng, J. C. de la Torre, K. G. Andersen, A. Goba, M. Momoh, M. Fullah, M. Gbakie, L. Kanneh, V. J. Koroma, R. Fonnie, S. C. Jalloh, B. Kargbo, M. A. Vandi, M. Gbetuwa, O. Ikponmwosa, D. A. Asogun, P. O. Okokhere, O. A. Follarin, J. S. Schieffelin, K. R. Pitts, J. B. Geisbert, P. C. Kulakowski, R. B. Wilson, C. T. Happi, P. C. Sabeti, S. M. Gevao, S. H. Khan, D. S. Grant, T. W. Geisbert, E. O. Saphire, L. M. Branco, and R. F. Garry, 2016, Most neutralizing human monoclonal antibodies target novel epitopes requiring both Lassa virus glycoprotein subunits: *Nat Commun*, v. 7, p. 11544.
- Rodriguez-Carreno, M. P., M. S. Nelson, J. Botten, K. Smith-Nixon, M. J. Buchmeier, and J. L. Whitton, 2005, Evaluating the immunogenicity and protective efficacy of a DNA vaccine encoding Lassa virus nucleoprotein: *Virology*, v. 335, p. 87-98.
- Rose, M. C., and J. A. Voynow, 2006, Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease: *Physiol Rev*, v. 86, p. 245-78.
- Rosenthal, M., N. Gogrefe, D. Vogel, J. Reguera, B. Rauschenberger, S. Cusack, S. Günther, and S. Reindl, 2017, Structural insights into reptarenavirus cap-snatching machinery: *PLoS Pathog*, v. 13, p. e1006400.
- Ross, A. J., L. A. Dailey, L. E. Brighton, and R. B. Devlin, 2007, Transcriptional profiling of mucociliary differentiation in human airway epithelial cells: *Am J Respir Cell Mol Biol*, v. 37, p. 169-85.
- Rubin, S., M. Eckhaus, L. J. Rennick, C. G. Bamford, and W. P. Duprex, 2015, Molecular biology, pathogenesis and pathology of mumps virus: *J Pathol*, v. 235, p. 242-52.
- Safronetz, D., J. E. Strong, F. Feldmann, E. Haddock, N. Sogoba, D. Brining, T. W. Geisbert, D. P. Scott, and H. Feldmann, 2013, A recently isolated Lassa virus from Mali demonstrates atypical clinical disease manifestations and decreased virulence in cynomolgus macaques: *J Infect Dis*, v. 207, p. 1316-27.
- Saito, T., and M. Gale, 2008, Differential recognition of double-stranded RNA by RIG-I-like receptors in antiviral immunity: *J Exp Med*, v. 205, p. 1523-7.
- Sajjan, U., Q. Wang, Y. Zhao, D. C. Gruenert, and M. B. Hershenson, 2008, Rhinovirus disrupts the barrier function of polarized airway epithelial cells: *Am J Respir Crit Care Med*, v. 178, p. 1271-81.

- Salvato, M. S., and E. M. Shimomaye, 1989, The completed sequence of lymphocytic choriomeningitis virus reveals a unique RNA structure and a gene for a zinc finger protein: *Virology*, v. 173, p. 1-10.
- Samuel, C. E., 2001, Antiviral actions of interferons: *Clin Microbiol Rev*, v. 14, p. 778-809, table of contents.
- Sauerhering, L., H. Müller, L. Behner, M. Elvert, S. K. Fehling, T. Strecker, and A. Maisner, 2017, Variability of interferon- λ induction and antiviral activity in Nipah virus infected differentiated human bronchial epithelial cells of two human donors: *J Gen Virol*, v. 98, p. 2447-2453.
- Schlie, K., A. Maisa, F. Freiberg, A. Groseth, T. Strecker, and W. Garten, 2010a, Viral protein determinants of Lassa virus entry and release from polarized epithelial cells: *J Virol*, v. 84, p. 3178-88.
- Schlie, K., A. Maisa, F. Lennartz, U. Ströher, W. Garten, and T. Strecker, 2010b, Characterization of Lassa virus glycoprotein oligomerization and influence of cholesterol on virus replication: *J Virol*, v. 84, p. 983-92.
- Schlie, K., T. Strecker, and W. Garten, 2010c, Maturation cleavage within the ectodomain of Lassa virus glycoprotein relies on stabilization by the cytoplasmic tail: *FEBS Lett*, v. 584, p. 4379-82.
- Schmidt, R., L. C. Beltzig, B. Sawatsky, O. Dolnik, E. Dietzel, V. Krähling, A. Volz, G. Sutter, S. Becker, and V. von Messling, 2018, Generation of therapeutic antisera for emerging viral infections: *NPJ Vaccines*, v. 3, p. 42.
- Sheehan, J. K., M. Kesimer, and R. Pickles, 2006, Innate immunity and mucus structure and function: *Novartis Found Symp*, v. 279, p. 155-66; discussion 167-9, 216-9.
- Shi, M., X. D. Lin, X. Chen, J. H. Tian, L. J. Chen, K. Li, W. Wang, J. S. Eden, J. J. Shen, L. Liu, E. C. Holmes, and Y. Z. Zhang, 2018, The evolutionary history of vertebrate RNA viruses: *Nature*, v. 556, p. 197-202.
- Shimajima, M., U. Ströher, H. Ebihara, H. Feldmann, and Y. Kawaoka, 2012, Identification of cell surface molecules involved in dystroglycan-independent Lassa virus cell entry: *J Virol*, v. 86, p. 2067-78.
- Singh, D., K. L. McCann, and F. Imani, 2007, MAPK and heat shock protein 27 activation are associated with respiratory syncytial virus induction of human bronchial epithelial monolayer disruption: *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, v. 293, p. L436-45.
- Sommerey, C., S. Paul, P. Staeheli, and T. Michiels, 2008, IFN- λ (IFN- λ) is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily acts on epithelial cells in vivo: *PLoS Pathog*, v. 4, p. e1000017.
- Sommerstein, R., L. Flatz, M. M. Remy, P. Malinge, G. Magistrelli, N. Fischer, M. Sahin, A. Bergthaler, S. Igonet, J. Ter Meulen, D. Rigo, P. Meda, N. Rabah, B. Coutard, T. A. Bowden, P. H. Lambert, C. A. Siegrist, and D. D. Pinschewer, 2015, Arenavirus Glycan Shield Promotes Neutralizing Antibody Evasion and Protracted Infection: *PLoS Pathog*, v. 11, p. e1005276.
- Spina, D., 1998, Epithelium smooth muscle regulation and interactions: *Am J Respir Crit Care Med*, v. 158, p. S141-5.
- Staehelin, L. A., 1973, Further observations on the fine structure of freeze-cleaved tight junctions: *J Cell Sci*, v. 13, p. 763-86.
- Stenglein, M. D., C. Sanders, A. L. Kistler, J. G. Ruby, J. Y. Franco, D. R. Reavill, F. Dunker, and J. L. Derisi, 2012, Identification, characterization, and in vitro culture of highly divergent arenaviruses from boa constrictors and annulated tree boas: candidate etiological agents for snake inclusion body disease: *mBio*, v. 3, p. e00180-12.
- Stokes, K. L., M. G. Currier, K. Sakamoto, S. Lee, P. L. Collins, R. K. Plemper, and M. L. Moore, 2013, The respiratory syncytial virus fusion protein and neutrophils mediate the airway mucin response to pathogenic respiratory syncytial virus infection: *J Virol*, v. 87, p. 10070-82.
- Strecker, T., R. Eichler, J. Meulen, W. Weissenhorn, H. Dieter Klenk, W. Garten, and O. Lenz, 2003, Lassa virus Z protein is a matrix protein and sufficient for the release of virus-like particles [corrected]: *J Virol*, v. 77, p. 10700-5.

- Strecker, T., A. Maisa, S. Daffis, R. Eichler, O. Lenz, and W. Garten, 2006, The role of myristoylation in the membrane association of the Lassa virus matrix protein Z: *Viol J*, v. 3, p. 93.
- Sun, Y., R. Carrion, L. Ye, Z. Wen, Y. T. Ro, K. Brasky, A. E. Ticer, E. E. Schwegler, J. L. Patterson, R. W. Compans, and C. Yang, 2009, Protection against lethal challenge by Ebola virus-like particles produced in insect cells: *Virology*, v. 383, p. 12-21.
- Syedbasha, M., and A. Egli, 2017, Interferon Lambda: Modulating Immunity in Infectious Diseases: *Front Immunol*, v. 8, p. 119.
- Takeuchi, O., and S. Akira, 2009, Innate immunity to virus infection: *Immunol Rev*, v. 227, p. 75-86.
- Thornton, D. J., K. Rousseau, and M. A. McGuckin, 2008, Structure and function of the polymeric mucins in airways mucus: *Annu Rev Physiol*, v. 70, p. 459-86.
- Troyanovsky, S. M., V. I. Guelstein, T. A. Tchipsheva, V. A. Krutovskikh, and G. A. Bannikov, 1989, Patterns of expression of keratin 17 in human epithelia: dependency on cell position: *J Cell Sci*, v. 93 (Pt 3), p. 419-26.
- Tsukita, S., M. Furuse, and M. Itoh, 2001, Multifunctional strands in tight junctions: *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 2, p. 285-93.
- Upadhyay, S., and L. Palmberg, 2018, Air-Liquid Interface: Relevant In Vitro Models for Investigating Air Pollutant-Induced Pulmonary Toxicity: *Toxicol Sci*, v. 164, p. 21-30.
- Urbanowicz, R. A., C. P. McClure, B. King, C. P. Mason, J. K. Ball, and A. W. Tarr, 2016, Novel functional hepatitis C virus glycoprotein isolates identified using an optimized viral pseudotype entry assay: *J Gen Virol*, v. 97, p. 2265-2279.
- van der Strate, B. W., L. Beljaars, G. Molema, M. C. Harmsen, and D. K. Meijer, 2001, Antiviral activities of lactoferrin: *Antiviral Res*, v. 52, p. 225-39.
- van Meer, G., and K. Simons, 1986, The function of tight junctions in maintaining differences in lipid composition between the apical and the basolateral cell surface domains of MDCK cells: *EMBO J*, v. 5, p. 1455-64.
- Vareille, M., E. Kieninger, M. R. Edwards, and N. Regamey, 2011, The airway epithelium: soldier in the fight against respiratory viruses: *Clin Microbiol Rev*, v. 24, p. 210-29.
- von Boehmer, H., 2005, Mechanisms of suppression by suppressor T cells: *Nat Immunol*, v. 6, p. 338-44.
- Walker, D. H., J. B. McCormick, K. M. Johnson, P. A. Webb, G. Komba-Kono, L. H. Elliott, and J. J. Gardner, 1982, Pathologic and virologic study of fatal Lassa fever in man: *Am J Pathol*, v. 107, p. 349-56.
- Wang, H., G. Wong, W. Zhu, S. He, Y. Zhao, F. Yan, M. N. Rahim, Y. Bi, Z. Zhang, K. Cheng, H. Jin, Z. Cao, X. Zheng, W. Gai, J. Bai, W. Chen, Y. Zou, Y. Gao, G. F. Gao, S. Yang, X. Xia, and X. Qiu, 2019, Equine-Origin Immunoglobulin Fragments Protect Nonhuman Primates from Ebola Virus Disease: *J Virol*, v. 93.
- Warfield, K. L., C. M. Bosio, B. C. Welcher, E. M. Deal, M. Mohamadzadeh, A. Schmaljohn, M. J. Aman, and S. Bavari, 2003, Ebola virus-like particles protect from lethal Ebola virus infection: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 100, p. 15889-94.
- Warfield, K. L., D. L. Swenson, D. L. Negley, A. L. Schmaljohn, M. J. Aman, and S. Bavari, 2004, Marburg virus-like particles protect guinea pigs from lethal Marburg virus infection: *Vaccine*, v. 22, p. 3495-502.
- Warner, N. L., J. D. Jokinen, J. I. Beier, K. J. Sokoloski, and I. S. Lukashevich, 2018, Mammarenaviral Infection Is Dependent on Directional Exposure to and Release from Polarized Intestinal Epithelia: *Viruses*, v. 10.
- Watanabe, Y., J. Raghvani, J. D. Allen, G. E. Seabright, S. Li, F. Moser, J. T. Huiskonen, T. Strecker, T. A. Bowden, and M. Crispin, 2018, Structure of the Lassa virus glycan shield provides a model for immunological resistance: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 115, p. 7320-7325.
- Weichselbaum, M., M. P. Sparrow, E. J. Hamilton, P. J. Thompson, and D. A. Knight, 2005, A confocal microscopic study of solitary pulmonary neuroendocrine cells in human airway epithelium: *Respir Res*, v. 6, p. 115.

- Whitmer, S. L. M., T. Strecker, D. Cadar, H. P. Dienes, K. Faber, K. Patel, S. M. Brown, W. G. Davis, J. D. Klena, P. E. Rollin, J. Schmidt-Chanasit, E. Fichet-Calvet, B. Noack, P. Emmerich, T. Rieger, S. Wolff, S. K. Fehling, M. Eickmann, J. P. Mengel, T. Schultze, T. Hain, W. Ampofo, K. Bonney, J. N. D. Aryeekuaye, B. Ribner, J. B. Varkey, A. K. Mehta, G. M. Lyon, G. Kann, P. De Leuw, G. Schuettfort, C. Stephan, U. Wieland, J. W. U. Fries, M. Kochanek, C. S. Kraft, T. Wolf, S. T. Nichol, S. Becker, U. Ströher, and S. Günther, 2018, New Lineage of Lassa Virus, Togo, 2016: *Emerg Infect Dis*, v. 24, p. 599-602.
- Widdicombe, J. G., and R. J. Pack, 1982, The Clara cell: *Eur J Respir Dis*, v. 63, p. 202-20.
- Wilda, M., N. Lopez, J. C. Casabona, and M. T. Franze-Fernandez, 2008, Mapping of the tacaribe arenavirus Z-protein binding sites on the L protein identified both amino acids within the putative polymerase domain and a region at the N terminus of L that are critically involved in binding: *J Virol*, v. 82, p. 11454-60.
- Wolff, H., J. V. Lange, and P. A. Webb, 1978, Interrelationships among arenaviruses measured by indirect immunofluorescence: *Intervirology*, v. 9, p. 344-50.
- Wright, K. E., R. C. Spiro, J. W. Burns, and M. J. Buchmeier, 1990, Post-translational processing of the glycoproteins of lymphocytic choriomeningitis virus: *Virology*, v. 177, p. 175-83.
- Wu, R., G. H. Sato, and M. J. Whitcutt, 1986, Developing differentiated epithelial cell cultures: airway epithelial cells: *Fundam Appl Toxicol*, v. 6, p. 580-90.
- Xing, J., H. Ly, and Y. Liang, 2015, The Z proteins of pathogenic but not nonpathogenic arenaviruses inhibit RIG-I-like receptor-dependent interferon production: *J Virol*, v. 89, p. 2944-55.
- York, J., S. S. Agnihothram, V. Romanowski, and J. H. Nunberg, 2005, Genetic analysis of heptad-repeat regions in the G2 fusion subunit of the Junín arenavirus envelope glycoprotein: *Virology*, v. 343, p. 267-74.
- Young, P. R., and C. R. Howard, 1983, Fine structure analysis of Pichinde virus nucleocapsids: *J Gen Virol*, v. 64 (Pt 4), p. 833-42.
- Zanin, M., B. Marathe, S. S. Wong, S. W. Yoon, E. Collin, C. Oshansky, J. Jones, B. Hause, and R. Webby, 2015, Pandemic Swine H1N1 Influenza Viruses with Almost Undetectable Neuraminidase Activity Are Not Transmitted via Aerosols in Ferrets and Are Inhibited by Human Mucus but Not Swine Mucus: *J Virol*, v. 89, p. 5935-48.
- Zheng, X., G. Wong, Y. Zhao, H. Wang, S. He, Y. Bi, W. Chen, H. Jin, W. Gai, D. Chu, Z. Cao, C. Wang, Q. Fan, H. Chi, Y. Gao, T. Wang, N. Feng, F. Yan, G. Huang, Y. Zheng, N. Li, Y. Li, J. Qian, Y. Zou, G. Kobinger, G. F. Gao, X. Qiu, S. Yang, and X. Xia, 2016, Treatment with hyperimmune equine immunoglobulin or immunoglobulin fragments completely protects rodents from Ebola virus infection: *Sci Rep*, v. 6, p. 24179.
- Ziegler, C. M., P. Eisenhauer, E. A. Bruce, M. E. Weir, B. R. King, J. P. Klaus, D. N. Kremontsov, D. J. Shirley, B. A. Ballif, and J. Botten, 2016, The Lymphocytic Choriomeningitis Virus Matrix Protein PPXY Late Domain Drives the Production of Defective Interfering Particles: *PLoS Pathog*, v. 12, p. e1005501.

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
Abb. 2.1	Schematische Darstellung des Arenavirus (a) und seiner Genomorganisation (b).	5
Abb. 2.2	Schematische Darstellung der Transkription und Genomreplikation der Arenaviren.	8
Abb. 5.1	Schematische Darstellung des Transwell-Filter Systems mit respiratorischen Epithelzellen als ALI-Zellkultur	45
Abb. 5.2	Ausbildung eines polaren Phänotyps in HBEpCs.	46
Abb. 5.3	Ausbildung eines differenzierten respiratorischen Epithels.	48
Abb. 5.4	LASV-Eintritt und Freisetzung in differenzierten HBEpCs	50
Abb. 5.5	LASV-Ausbreitung in die Submukosa.	51
Abb. 5.6	LASV Wirtszelltropismus in den humanen Atemwegen	54
Abb. 5.7	Wirtszelltropismus von IAV und VSV in HBEpCs.	55
Abb. 5.8	Virusinhibitionstest mit Atemwegsmukus.	56
Abb. 5.9	Mukusinhibitionstest in A549-Zellen.	57
Abb. 5.10	IFN-Induktion in HBEpCs durch eine LASV-Infektion.	58
Abb. 5.11	LASV Reduktion bei IFN- λ -Stimulation.	60
Abb. 5.12	Herstellung von LASV GP VLPs für die Immunisierung	62
Abb. 5.13	Erkennung von LASV GP durch GP VLP induzierte Antikörper.	64
Abb. 5.14	Quantifizierung von LASV GP-spezifischen Antikörpern.	66
Abb. 5.15	Kreuzreaktivität der Kaninchenserum gegen das GP von fünf LASV Linien und LCMV GP.	67
Abb. 5.16	Nachweis von LASV GP VLP-induzierten kreuzneutralisierenden Antikörpern.	69
Abb. 5.17	Nachweis von neutralisierenden Antikörpern in Hyperimmunseren und humanen Rekonvaleszentenserum	70
Abb. 5.18	Die Induktion von neutralisierenden Antikörpern erfordert eine mehrmalige LASV GP VLP-Immunisierung.	72
Abb. 5.19	Mechanismus der LASV-Neutralisation.	73
Abb. 5.20	IgG-Antikörper Aufreinigung und Charakterisierung.	74
Abb. 5.21	Hemmung der VSV Δ G/LASVGP-Infektion in humanen LASV-Zielzellen.	76
Abb. 6.1	Überwindung der epithelialen Barriere.	80
Tab. 4.1	Zellkulturmedien und Zusätze für die Kultivierung von eukaryotischen Zelllinien.	33

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
abs.	Absolut
AJ	<i>Adherens junctions</i>
ALI	<i>Air-liquid-interface</i>
AP-1	<i>activator protein 1</i>
BSL2	<i>Biosafety level 2</i>
BSL4	<i>Biosafety level 4</i>
CCP	<i>Clara cell protein</i>
CD	Zytoplasmatische Domäne
cDNA	Copy DNA
CK	Zytokeratin
cm ²	Quadratzenimeter
CPE	<i>Cytopathic effect</i> für Zytopathischer Effekt
C _T	<i>Cycle Threshold</i> für Schwellenwert-Zyklus
D0 Seren	Präimmunseren
D77 Seren	Seren nach finaler Blutung
D	Dalton
DC-SIGN	<i>dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grapping nonintegrin</i>
dp ALI	<i>Days post „Air-lifting“</i>
dpi	<i>Days post infection</i>
dps	<i>Days post seeding</i>
ds	Doppelsträngig
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ESCRT	<i>endosomal sorting complexes required for transport</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetals Kälberserum
FSC-H	Vorwärtsstreulicht, engl. <i>forward scatter</i>
g	mittlere Erdbeschleunigung
G	Glykoprotein vom Vesikulären Stomatitis Virus

GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GMT	Geometrischer Mittelwert
GP	Glykoprotein
GP1 und GP2	LASV Glykoprotein1 und 2
GPC	Ungespaltenes LASV Glykoprotein
h	Stunde
HBEpC	Primäre Humane Bronchiale Epithelzellen
hpi	<i>Hours post infection</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IAV	Influenza A Virus
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
ID ₅₀	Belastungsdosis, engl. <i>infection dose</i>
IFN	Interferon
IFNAR1 und-2	Interferon α/β Rezeptor 1 und -2
IFNLR1	<i>Interferon Lambda Receptor 1</i>
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IL10R β	Interleukin 10-Rezeptor, Beta-Untereinheit
IPMA	<i>Immunoperoxidase Monolayer Assay</i>
IRF 3	<i>Interferon regulating factor 3</i>
ISG	<i>interferon-stimulated gene</i>
JAM-A	<i>junctional adhesion molecule-1</i>
kb	Kilobasen
KIF13A	<i>Kinesin family member 13A</i>
KLSM	Konfokales Laser Scanning Mikroskop
LAMP1	<i>Lysosomal-associated membrane protein 1</i>
LASV	Lassavirus
LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitisvirus
LF	Lassafieber
LSEctin	<i>liver and lymphnode sinusoidal endothelial calcium-dependent lectin</i>
M	Molar
mA	Milliampere
MDA5	<i>Melanoma Differentiation-Associated protein 5</i>
mg	Milligramm
min	Minuten

Mio.	Millionen
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MTP	Mikrotiterplatte
MUC	Muzin
Mx-Protein	Interferon-induziertes GTP-bindendes Protein Mx1
Nektin-4	<i>Nectin Cell Adhesion Molecule 4</i>
NFκB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NOD	<i>Nucleotide binding oligomerization domain</i>
NP	Nukleoprotein
OAS	Oligoadenylatsynthetase
OD	Optische Dichte
p63	Tumorprotein 63
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFU/ml	<i>Plaque forming units</i> pro milliliter
pHAEC	<i>Primary human airway epithelial cells</i>
PKR	Proteinkinase R
PNEC	Pulmonale Neuroendokrine Zellen
PP	Probenpuffer
PräGPC	Vorläufer des LASV viralen Glykoproteins GPC
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
PTM	Posttranslationale Modifikation
Rb#347	LASV GP VLP-immunisiertes Kaninchen 347
Rb#350	LASV GP VLP-immunisiertes Kaninchen 350
RIG-I	<i>retinoic acid-inducible gene 1</i>
RING	<i>Really Interesting New Gene</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoproteine
Rpm	<i>Rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur

RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
S1P	<i>Site-1 protease</i>
SD	Standardabweichung
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacryamid Elektrophorese
Sek	Sekunde
SKI-1	<i>Subtilisin kexin isozyme-1</i>
SKI-1/S1P	<i>Subtilisin kexin isozyme-1/ site-1 protease</i>
SPase	Signalpeptidase
ss	einzelsträngig
SSC-H	Seitwärtsstreulicht, engl. <i>side scatter</i>
SSP	<i>Stable signal peptide</i> für stabiles Signalpeptid
TAM Rezeptoren	Tyro3, Axl, Mer Rezeptoren
TCID ₅₀	<i>Tissue Culture Infection Dose50</i>
TEER	<i>Transepithelial electrical resistance</i> für transepithelialen elektrischen Widerstand
TFF-3	<i>Trefoil factor 3</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i>
T _H 1 und T _H 2	T-Helferzelle 1 und T-Helferzelle 2
TJ	<i>Tight junctions</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TM-Domäne	Transmembrandomäne
TNF α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
T _{reg}	Regulatorische T-Zelle
TRITC	Tetramethylrhodamin
TSLP	Thymus-Stromal-Lymphopoietin
U/ml	Units pro Milliliter
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenanteil
VLP	<i>Virus-like particel</i> für Virus-ähnliche Partikel
VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus
VSV Δ G/LASVGP	Vesikuläre Stomatitis Virus, das das LASV GP exprimiert
ZO	Zonula occludens
α -DG	α -Dystroglykan
Ω	Ohm

Veröffentlichungen

Publikationen

Development and characterization of an indirect ELISA to detect SARS-CoV-2 spike protein-specific antibodies. Krähling V, Halwe S, Rohde C, Becker D, Berghöfer S, Dahlke C, Eickmann M, Ercanoglu MS, Gieselmann L, Herwig A, Kupke A, **Müller H**, Neubauer-Rädel P, Klein F, Keller C, Becker S. (J Immunol Methods. 2021 Mar;490:112958. doi: 10.1016/j.jim.2021.112958. Epub 2021 Jan 4.

Polymer microarrays rapidly identify competitive adsorbents of virus-like particles. Blok AJ, Gurnani P, Xenopoulos A, Burroughs L, Duncan J, Urbanowicz RA, Tsoleridis T, **Müller-Kräuter H**, Strecker T, Ball JK, Alexander C, Alexander MR. 2020. Biointerphases. 17;15(6):061005.

Adjuvant formulated virus-like particles expressing native-like forms of the Lassa virus envelope surface glycoprotein are immunogenic and induce antibodies with broadly neutralizing activity. **Müller H**, Fehling SK, Dorna J, Urbanowicz RA, Oestereich L, Krebs Y, Kolesnikova L, Schauflinger M, Krähling V, Magassouba N’F, Fichet-Calvet E, Ball JK, Kaufmann A, Bauer S, Becker S, Messling Vv and Strecker T (NPJ Vaccines. 2020;5:71. Published 2020 Aug 4. doi:10.1038/s41541-020-00219-x)

Interferon- λ induction and antiviral activity in Nipah virus infected differentiated human bronchial epithelial cells. Sauerhering L, **Müller H**, Behner L, Elvert M, Fehling SK, Strecker T und Maisner A (J Gen Virol. 2017 Oct;98(10):2447-2453)

Lassa Virus Infection of Primary Human Airway Epithelial Cells. **Müller-Kräuter H**, Fehling SK, Sauerhering L, Koepke J, Röder J, Matrosovich M, Maisner A and Strecker T (in Revision)

Vorträge

Lassa virus infection of the human bronchial epithelium

66. Treffen der japanischen Gesellschaft für Virologie in Kyoto, Japan; Oktober 2018

Host cell tropism and receptor specificity of Lassa virus infection in the human respiratory tract

Im Rahmen des Sonderforschungsbereich 1021 in Gießen, Deutschland; November 2016

Posterpräsentationen

Entry and release of Lassa virus in well-differentiated primary bronchial epithelial cells

Müller H, Fehling SK, Strecker T

17. Negativ-Strang-RNA-Virus Treffen in Verona, Italien; Juni 2018

Comparative study of Lassa virus replication in immortalized cells and in primary cells derived from the human airway epithelium

Müller H, Fehling SK, Koepke J, Strecker T

26. Treffen der Deutschen Gesellschaft für Virologie (GfV) in Münster, Deutschland; April 2016

Host cell tropism of Lassa virus in the human respiratory tract

Müller H, Fehling SK, Matrosovich M, Strecker T

27. Treffen der Deutschen Gesellschaft für Virologie (GfV) in Marburg, Deutschland; März 2017

Verzeichnis der akademischen Lehrer/-innen

Meine akademischen Lehrenden waren in Marburg

Bacher, Michael, Prof. Dr.	Steinhoff, Ulrich, Prof.Dr.
Bauer, Stefan, Prof. Dr.	Strauer, Dorothea, Dr.
Bauer, Uta-Maria, Prof. Dr.	Weber, Friedemann, Prof. Dr.
Brandt, Dominique, Dr.	Westermann, Reiner, PD Dr.
Brehm, Alexander, Prof. Dr.	Wrocklage, Christian, Dr.
Daut, Jürgen, Prof. Dr. Dr.	Yu, Philipp, Dr.
del Rey, Adriana, Prof. Dr.	
Dempfle, Astrid, Prof. Dr.	
Einhäuser-Treyer, Wolfgang, Prof. Dr.	
Elsässer, Hans-Peter, Prof. Dr.	
Feuser, Beate, Dr.	
Fritz, Barbara, Dr.	
Greiner, Andreas, Prof. Dr.	
Grzeschik, Karl-Heinz, Prof. Dr.	
Halaszovich, Christian, Dr.	
Huber, Magdalena, Prof. Dr.	
Jacob, Ralf, Prof. Dr.	
Kaufmann, Andreas, Dr.	
Lill, Roland, Prof. Dr.	
Lingelbach, Gabriele, Prof. Dr.	
Lohöfer, Helga, Dr.	
Lohoff, Michael, Prof. Dr.	
Maisner, Andrea, Prof. Dr.	
Mühlenhoff, Ulrich, Prof. Dr.	
Müller, Rolf, Prof. Dr.	
Müller-Brüsselbach, Sabine, Dr. PD	
Oliver, Dominik, Dr.	
Plant, Timothy David, Prof. Dr.	
Preisig-Müller, Regina, PD Dr.	
Schäfer, Helmut, Prof. Dr.	
Schmeck, Bernd, Prof. Dr.	
Schnare, Markus, Prof. Dr. rer. physiol.	
Schütz, Alexander, Prof. Dr.	

Danksagung

Bei Herrn Dr. Thomas Strecker möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen und für die Bereitstellung eines sehr spannenden Themas, das ich seit dem Beginn meiner Bachelorarbeit erarbeitet habe und das sich immer weiterentwickelt hat. Darüber hinaus bedanke ich mich für die Möglichkeit, an zahlreichen Projekten mitarbeiten zu können, für die Diskussionsbereitschaft und dafür, dass er mir stets ein Mentor und Förderer ist.

Bei Herrn Prof. Dr. Stephan Becker bedanke ich mich für die sehr guten Arbeitsbedingungen am Institut für Virologie und das angenehme Arbeitsklima.

Dr. Sarah Katharina Fehling danke ich für die tolle Betreuung und Zusammenarbeit im Labor und an gemeinsamen Projekten. Ich danke ihr für die Einarbeitung ins BSL4-Labor und ihre stete Hilfsbereitschaft auf ihre ganz besondere und warmherzige Art.

Der Jürgen-Manchot-Stiftung und der *MARburg University Research Academy* danke ich für die finanzielle Förderung meiner Arbeit durch ein Promotionsstipendium bzw. Promotionsabschlusstipendium.

Für die tatkräftige Unterstützung möchte ich Petra Neubauer-Rädel danken. Allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der AG Strecker möchte ich für die wundervolle und herzliche Atmosphäre danken, ganz besonders Annika Meyer, Dr. Svenja Wolff und Birthe Ehlert. Außerdem möchte ich mich noch bei allen Mitarbeitern des Instituts für Virologie und den Mitarbeitern und Technikern des BSL4-Labors für das sehr angenehme Arbeitsklima bedanken.

Für die zur Verfügung gestellten Antikörper und Viren sowie Hilfestellungen möchte ich Prof. Dr. Andrea Maisner, Dr. Mikhail Matrosovich, Dr. Verena Krähling, Dirk Becker, Dr. Martin Schauflinger und Dr. Larissa Kolesnikowa aus dem Institut für Virologie danken.

Bei Dr. Lisa Oestereich aus dem Bernhard-Nocht-Institut in Hamburg, Dr. Richard Urbanowicz aus dem *Wolfson Centre for Global Virus Infections* der Universität Nottingham in Großbritannien und Jens Dorna aus dem Institut für Immunologie der Philipps-Universität Marburg möchte ich mich für die produktive Zusammenarbeit bedanken. Besonderer Dank gilt auch Dr. Ansgar Schmidt aus dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Marburg für die Unterstützung bei den histologischen Techniken und die Möglichkeit zur Zusammenarbeit.

Ulrike Felgenhauer, Dr. Sarah Katharina Fehling und Birthe Ehlert danke ich ganz herzlich für die Korrekturen dieser Arbeit.

Ein großer Dank gilt meinen Freunden und Mitstreitern Johanna West, Ulrike Felgenhauer und Martin Zickler für die unvergessliche Studienzeit und die wundervolle Promotionszeit in Marburg.

Ganz außerordentlich bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern Walter und Ludmila Müller, die mich immer in allem unterstützt haben und bei meinen Geschwistern Olga und Thomas, die immer großes Interesse und viel Begeisterung gezeigt haben. Meinem Mann Andreas Kräuter und Alessandro danke ich für ihre Geduld und Unterstützung in allen Lebenslagen.